ORSAY
n° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THÈSE

PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT

SPECIALITE : SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude DELCAYRE

Sujet : LES MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'ATP ase MYOFIBRILLAIRE CARDIAQUE.

rôle de la phosphorylation de la myosine

SOUTENUE LE 30 MAI 1983 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. E. CORABOEUF	Président
A. D'ABLIS	Rapporteur
J. DEMAILLE	–
P. Y. HATT	–
L. RAPPAPORT	–
B. SWYNGHEDAUW	–

UNIV.
LIBRARY
IOWA

ORSAY
n° d'ordre

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

THÈSE

PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT

SPECIALITE : SCIENCES NATURELLES

PAR

Claude **DELCAYRE**

Sujet : LES MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'ATP ase MYOFIBRILLAIRE CARDIAQUE.

rôle de la phosphorylation de la myosine

SOUTENUE LE 30 MAI 1983 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MM. E. CORABOEUF	Président
A. D'ABLIS	Rapporteur
J. DEMAILLE	–
P. Y. HATT	–
L. RAPPAPORT	–
B. SWYNGHEDAUW	–

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543524_0004

que MM. CORABOEUF
D'ALBIS
DEMAILLE
HATT
RAPPAPORT
SWYNGHEDAUW,

qui ont accepté de faire partie de ce jury et m'honorent ainsi de l'intérêt qu'ils portent à ce travail, veuillent trouver ici l'expression de mes remerciements.

Il est bien évident que ce travail doit beaucoup à la collaboration amicale de tous ceux qui m'ont aidé de leurs conseils et de leur aide matérielle.

C'est pourquoi je souhaite remercier tout particulièrement :

Bernard Swynghedauw qui m'a accueilli dans son équipe et a dirigé ces travaux. Son enthousiasme et sa curiosité scientifiques ont été un puissant stimulant.

Lydie Rappaport qui m'a apporté son expérience et son aide efficace dans les moments difficiles.

Ketty Schwartz qui a suivi avec intérêt ce travail jusqu'à la rédaction du manuscrit et n'a pas ménagé ses conseils.

Jacques Demaille qui m'a amicalement accueilli à Montpellier et fait profiter de son expérience. Que les membres de son équipe et Michael P. Walsh soient également remerciés.

Guy Berson qui a effectué une grande partie des mesures de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine.

Jane-Lyse Samuel qui a réalisé les marquages par immunofluorescence.

Josiane Bercovici, Françoise Marotte, Jean-Jacques Mercadier et Madeleine Préteseille pour avoir effectué les modèles expérimentaux.

Bénédicte Bertier, Jean-Claude Cavadore, Danièlle Charlemagne, Anne-Marie Lompré, Lydie Rappaport et Ketty Schwartz pour avoir préparé les anticorps.

Nurjahn qui s'est enthousiasmée pour l'Apple II.

Mes amis de l'Unité 127 qui m'ont fait profiter de leurs suggestions.

Il est d'usage que les premières pages d'une thèse conservent une pensée émue pour les membres de la famille proche, qui ont leur part dans la réalisation matérielle . Dont acte.

Il est également fréquent de trouver une citation à méditer. Celle-ci, qui n'entraînera pas de céphalées, est destinée à introduire le sujet.

"Le coeur humain bat en moyenne 12 643 698 953 fois au cours d'une vie, nombre formidable à première vue. Il n'y a pourtant pas de quoi s'étonner si l'on réfléchit qu'il n'a RIEN D'AUTRE A FAIRE."

F. CAVANNA

ABREVIATIONS

AMPc : Adenosine 3',5', monophosphate cyclique
ATP : Adénosine triphosphate
CaM : Calmoduline
DEAE : Diéthyl aminoéthyl
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide éthylènediamine tétraacétique
EGTA : Acide éthylène-bis (oxyéthylènenitrilo) tétraacétique
L2 : Chaîne légère phosphorylable de myosine de muscle strié
MK : Myosine kinase
PMSF : Phénylméthyl sulfonyl fluorure
Tris : Trihydroxyméthyl aminométhane

SOMMAIRE

INTRODUCTION

A. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA MYOSINE ET SA PHOSPHORYLATION

1. LA MYOSINE
1.1. Role structural page 4
1.2. Propriétés physiques 4
1.2.1. Les chaînes lourdes 6
1.2.2. Les chaînes légères 7
1.2.2.1. La chaîne légère phosphorylable 7
1.2.2.2. Les chaînes légères non phosphorylables 11
1.3. L'activité ATPase 12
1.3.1. Le site enzymatique 13
1.3.2. Le mécanisme enzymatique 13
1.3.3. Le contrôle de l'activité 15
1.3.3.1. Les protéines du filament fin 15
1.3.3.2. L'ATPase de la myosine 17
1.3.3.3. L'ATPase de l'actomyosine et des myofibrilles 18
1.4. La contraction musculaire 20
1.4.1. Modèles théoriques 20
1.4.2. Mécanisme biochimique 22
1.4.2.1. Le rôle du calcium 22
1.4.2.2. Contrôle de la contraction 25
1.5. Relation entre ATPase et propriétés contractiles 27
1.5.1. Variations de l'ATPase 27
1.5.2. La contractilité musculaire 28

2. LA PHOSPHORYLATION DE LA CHAINE LEGERE 31
2.1. La myosine kinase 31
2.1.1. La calmoduline 33
2.1.1.1. Distribution 33
2.1.1.2. Propriétés physico-chimiques 34
2.1.1.3. Fonction 37

2.1.2. L'apoenzyme 37
2.1.2.1. Les myosine kinases : propriétés communes 39
2.1.2.2. Les myosine kinases : spécifiques du tissu ? 43
2.2. Les phosphatases 46
2.3. La phosphorylation de la chaîne légère : son rôle 46
2.3.1. Le muscle lisse et les systèmes non musculaires 47
2.3.2. Le muscle strié squelettique 48
2.3.3. Le coeur 48

B. OBJECTIF DU TRAVAIL 51

C. RESULTATS 54

1. LES MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES DE LA MYOSINE 54
1.1. En fonction de l'espèce 54
1.2. En fonction du muscle cardiaque 55
1.3. Sous l'influence de la thyroxine 55
1.4. Article 1 : A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. 57
1.5. Article 2 : Comparison of ATPase activity and light subunits in myosins from left and right ventricles and atria in seven mammalian species. 66
1.6. Article 3 : Myosin synthesis and enzymatic properties during thyroxine intoxication in rabbits. 74

2. LES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES DE LA MYOSINE 79
2.1. La myosine kinase dans le coeur hypertrophié 79
Article 4 : Unchanged myosine kinase activity in hypertrophied rat heart. 81
2.2. Phosphorylation de L2 dans le coeur hypertrophié 112
2.2.1. Méthode 1 112
2.2.2. Méthode 2 113
2.3. Révélation des protéines par immunofluorescence 117
2.3.1. Techniques 117
2.3.2. Résultats 118

2.4. Autres activités kinase calmoduline-dépendantes 124

Article 5 : Phosphorylation of a 43 kdaltons protein from rat heart by a calmodulin-dependent protein kinase. 126

D. DISCUSSION 131

1. RELATION ENTRE LA Ca^{2+}-ATPase ET LA CONTRACTILITE 131

2. SIGNIFICATION DES VARIATIONS DE LA MYOSINE ATPase 135

2.1. Variations physiologiques et pathologiques 135

2.2. Relation entre Ca^{2+}-ATPase et rendement énergétique 141

2.3. Pourquoi l'ATPase de la myosine varie-t-elle ? 145

3. MECANISMES DE VARIATION DE L'ATPase 145

3.1. Les modifications transcriptionnelles 145

3.2. Le contrôle transcriptionnel 148

4. LA PHOSPHORYLATION DE LA MYOSINE 150

4.1. La myosine kinase du coeur de rat 151

4.2. Rôle de la phosphorylation de la myosine 159

5. REVUE SUR LA BIOLOGIE DES SURCHARGES CARDIAQUES 162

5.1. Resumé 162

5.2. Article 6 : Biology of cardiac overload. 167

E. CONCLUSION 214

F. REFERENCES 215

INDEX DES FIGURES

1	Le sarcomère	page 5
2	Le site actif	8
3	Les chaînes légères de myosine	9
4	L'ATPase : schéma réactionnel	14
5	Le filament fin	16
6	Modèles de contraction	21
7	Relation ATPase-pCa	23
8	Phosphorylation de TnI	26
9	Courbes cardiaques tension-vitesse	29
10	Relation ATPase-Vmax	30
11	Evolution des calciprotéines	35
12	Séquence de la calmoduline	36
13	Activation de la myosine kinase par la calmoduline	41
14	Purification de L2 par isoélectrofocalisation	114
15	Phosphorylation de L2 en fonction de l'hypertrophie	115
16	Localisation de la myosine kinase dans le myocyte	120
17	" calmoduline "	122
18	Phosphorylation de la protéine de Mr 43.000	125
19	Libération initiale de phosphate	133
20	Relation rendement-vitesse de raccourcissement	142
21	Relation rendement-Vmax	143
22	Variation de l'ATPase : raisons énergétiques	144
23	Purification sommaire de la myosine kinase	153
24	Myosine kinase squelettique; effet d'un extrait cardiaque	154
25	Purification de myosine kinase myofibrillaire	158
	L'adaptation myocardique à la surcharge	166

INDEX DES TABLEAUX

I	Mesure de l'activité ATPase	19
II	Fonctions contrôlées par la calmoduline	38
III	Propriétés de la myosine kinase	44
IV	Variation de phosphorylation de L2 dans le coeur	49
V	Variations de l'ATPase de la myosine	136
VI	Concentrations tissulaires de la myosine kinase	156
VII	Effets de la phosphorylation de L2 dans le coeur	161

INTRODUCTION

Ce travail concerne les variations de l'activité enzymatique de la myosine cardiaque dans des situations physiologiques et pathologiques (thyrotoxicose, surcharge mécanique). L'objectif était de répondre à trois questions : 1/ En fonction de quels facteurs l'activité enzymatique de la myosine cardiaque varie-t-elle ? 2/ Quelle est la signification de telles variations ? 3/ La phosphorylation de la chaîne légère joue-t-elle un rôle dans les variations de l'ATPase de la myosine au cours des surcharges cardiaques ?

La première partie est consacrée à l'étude des modifications de l'activité ATPase d'origine transcriptionnelle. La myosine porte une activité ATPase qui fournit l'énergie nécessaire à la contraction. Elle comporte deux chaînes lourdes sur lesquelles se trouvent les sites enzymatiques et quatre chaînes légères dont deux sont phosphorylables par une kinase spécifique Ca^{2+}- et calmoduline-dépendante. Barany (1967) a observé une relation entre l'activité ATPase de la myosine du muscle squelettique et sa contractilité. Par contre, aucune étude systématique n'avait été effectuée sur le muscle cardiaque, dont la myosine a une activité enzymatique plus faible (Brahms et Kay 1963, Luchi et al. 1965, Swynghedauw et al. 1970). Les expériences de Henderson et al. (1970) montraient que la contractilité cardiaque variait en fonction de l'espèce. La mesure de l'activité ATPase de la myosine chez différentes espèces avait donc pour but de vérifier si une relation existait entre ce paramètre biochimique et les propriétés contractiles. Cette première étude a été effectuée sur la myosine ventriculaire. Les différences qui existent dans les conditions de travail des ventricules et des oreillettes justifiaient une étude comparative de l'activité ATPase de ces deux muscles cardiaques. Les premières études montrant un lien entre ATPase de la myosine et contractilité suggéraient qu'une variation d'un de ces paramètres devait entraîner la variation de l'autre. Parallèlement à cette idée, l'hypothèse de l'apparition d'une myosine différente dans certaines situations physiologiques (Trayer et Perry 1966) ou pathologiques (Swynghedauw et al. 1976) avait été avancée. Les études décrites avaient également pour objectif de mettre en évidence une

différence de structure entre des myosines présentant des activités différentes. La thyroxine entraîne une augmentation de la contractilité cardiaque (revue dans Freedberg et Hamolsky 1974) et cette situation a donc été choisie pour suivre l'évolution de la synthèse de la myosine en fonction de la variation d'activité enzymatique.

Dans une deuxième partie, la relation entre l'activité ATPase et une modification post-transcriptionnelle de la myosine a été étudiée. La phosphorylation de la chaîne légère est essentielle dans le déclenchement de la contraction du muscle lisse (Adelstein et Conti 1975, Aksoy et al. 1976, Chacko et al. 1977, Hoar et al. 1979, Sobieszek et Small 1977, Walsh et al. 1982c), tandis que son rôle est inconnu dans le muscle cardiaque. L'intervention possible de ce mécanisme dans la modulation de la contraction cardiaque a été étudiée en choisissant une situation pathologique, la surcharge mécanique, dans laquelle l'activité ATPase de la myosine est différente (revue dans Swynghedauw et al. 1976). La méthode consistait à vérifier s'il existait une relation entre l'ATPase de la myosine, diminuée, et la phosphorylation de la chaîne légère ou l'activité de la myosine kinase dans le coeur hypertrophié.

L'ensemble de ces travaux concerne donc les mécanismes biochimiques de l'adaptation cardiaque à des conditions de contraction nouvelles.

Les expériences réalisées montrent que l'ATPase de la myosine cardiaque varie en fonction de l'espèce. Elle est d'autant plus élevée que l'animal est plus petit. Les valeurs de l'ATPase de la myosine sont corrélées avec les valeurs de la vitesse maximale de raccourcissement à charge nulle publiées par Henderson et al. (1970). L'activité ATPase de la myosine est identique dans les ventricules droit et gauche. Par contre, l'activité ATPase des myosines auriculaires est supérieure à celle des myosines ventriculaires. Les chaînes légères des myosines auriculaires ont un poids moléculaire différent de celui des myosines ventriculaires. L'injection de thyroxine entraîne chez le lapin une augmentation de 100 % de l'activité ATPase de la myosine cardiaque. L'incorporation de ^{3}H-lysine dans la myosine cardiaque est corrélée avec l'augmentation de l'activité enzymatique et avec l'hypertrophie, ce qui est un argument en faveur de la synthèse d'une nouvelle myosine dans le coeur

hypertrophié. Ces variations de l'ATPase de la myosine, corrélées aux variations de contractilité cardiaque, sont interprétées comme une adaptation au changement des conditions du travail du coeur. La baisse du rendement énergétique de la fibre musculaire lorsqu'elle se contracte à une vitesse pour laquelle elle n'est pas adaptée, conjuguée à d'autres facteurs, pourrait être le mécanisme déclenchant la variation de l'ATPase de la myosine. D'autres auteurs ont montré que ces variations sont dues en partie à un changement de l'expression génétique de la myosine.

La myosine kinase du coeur de rat est purifiée environ 600 fois par chromatographie sur échangeur d'ions puis chromatographie d'affinité sur colonne de calmoduline-sepharose. L'activité myosine kinase calmoduline-dépendante est identique chez les animaux témoins et hypertrophiés. Le pourcentage de phosphorylation de la chaîne légère, mesuré après séparation des formes phosphorylée et déphosphorylée par isoélectrofocalisation, est identique dans les coeurs de rat normaux et hypertrophiés. Il est donc peu probable que ce système contrôle l'activité enzymatique de la myosine dans la surcharge chronique. La visualisation de la myosine kinase et de la calmoduline par immunofluorescence dans des myocytes cardiaques isolés montre que ces protéines sont des constituants du sarcomère dont la fonction reste à déterminer.

Une nouvelle activité kinase Ca^{2+}- et calmoduline-dépendante, qui phosphoryle un substrat endogène de Mr 43.000 différent de l'actine et de la troponine T, est mise en évidence dans le coeur de rat. La phosphorylation de la protéine de Mr 43.000 n'est pas modifiée de manière significative dans le coeur hypertrophié.

Les mécanismes d'adaptation du coeur à la surcharge de travail impliquent d'autres systèmes que l'appareil myofibrillaire. Une revue des connaissances actuelles sur la biochimie du coeur surchargé montre que le myocyte du coeur hypertrophié est une cellule modifiée, adaptée énergétiquement à une baisse de contractilité.

A. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA MYOSINE ET LA PHOSPHORYLATION DE SA CHAINE LEGERE

1. LA MYOSINE

1.1. Rôle structural

C'est la protéine formant le filament épais du sarcomère. La figure 1 montre la disposition schématique des filaments fins et épais, dont le glissement relatif entraîne le raccourcissement du muscle. Le schéma en coupe rend compte de la régularité du réseau filamentaire, confirmée par la microscopie électronique (voir notamment Hatt et al. 1970, 1972).

Les corps des molécules de myosine (environ 400 par filament (Morimoto et Harrington 1974)) forment le filament lui-même, et les têtes globulaires (S1) sont réparties de manière hélicoïdale à la surface du filament. Le centre du filament est dépourvu de têtes, à cause de l'organisation antiparallèle des molécules de myosine dans chaque demi-filament. Les têtes de la myosine comportent un site de fixation à l'actine du filament mince, réalisant une série de ponts entre les deux types de filaments. Dans la théorie du glissement (détaillée plus loin), ces têtes de myosine seraient articulées sur une charnière, et oscilleraient entre une position oblique (contraction) et perpendiculaire au filament (relaxation). La plupart des études structurales ont été effectuées sur le muscle squelettique. Si les propriétés contractiles et métaboliques du myocarde sont différentes de celles du muscle blanc, l'appareil contractile est similaire dans son principe. Les différences morphologiques entre coeur et muscle squelettique blanc, à l'échelle du sarcomère, portent surtout sur l'épaisseur de la ligne Z (80 nm dans le coeur au lieu de 30 dans le muscle blanc).

1.2. Propriétés physiques

La myosine a un poids moléculaire d'environ 500.000 et se compose de 2 chaînes lourdes (Mr 200.000 environ) et quatre chaînes légères (Mr 15.000 à 27.000) situées au voisinage des têtes des chaînes lourdes. Il existe plusieurs myosines différentes, selon le type de muscle considéré. Les variations de structure primaire sont reflétées par des

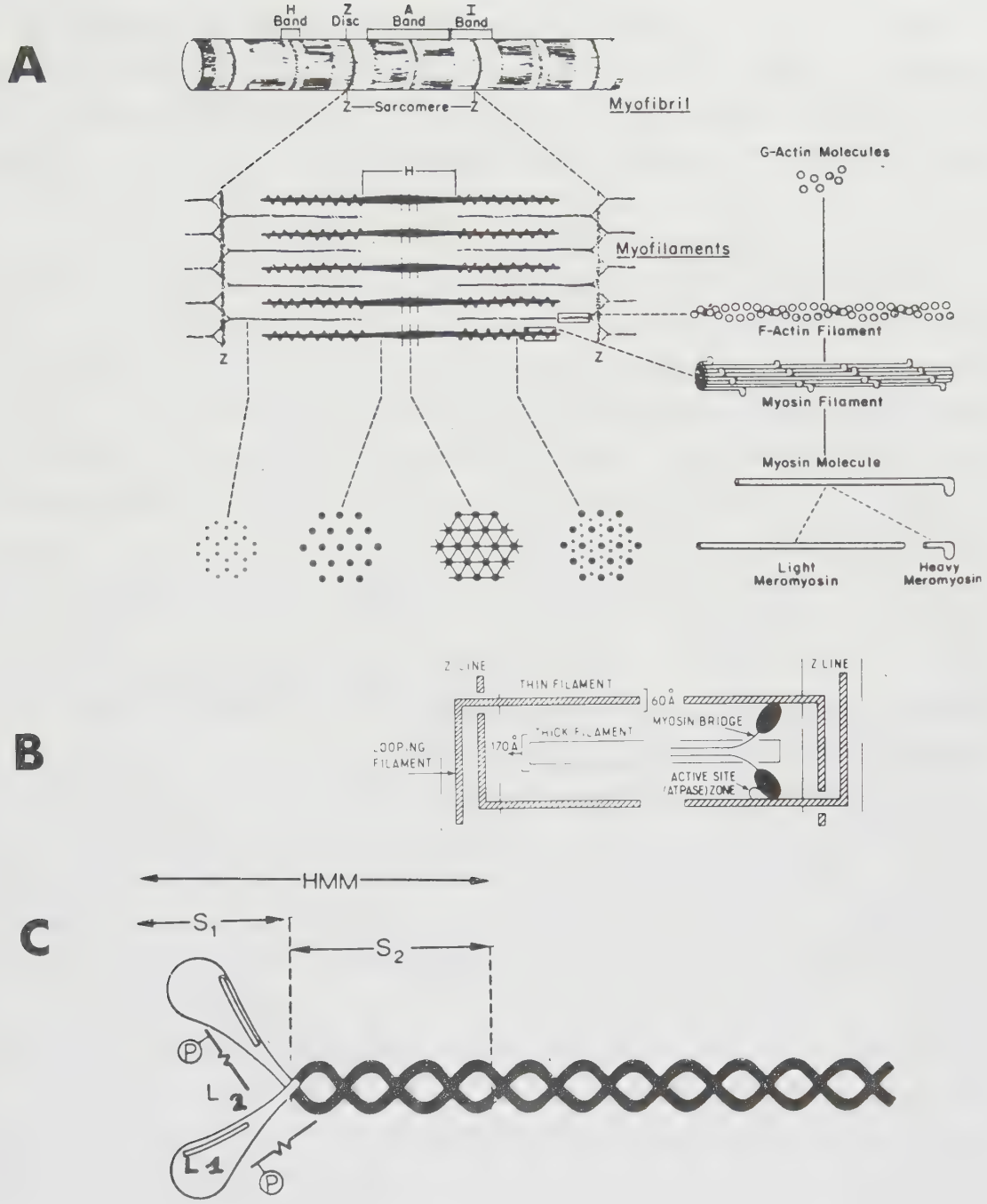


Figure 1 : A/ Description de l'appareil contractile (d'après Laki 1971). B/ Le sarcomère cardiaque, représenté schématiquement (d'après Leger et al. 1975). C/ Représentation schématique de la molécule de myosine. Le phosphore incorporé à la chaîne légère est indiqué par P.

différences dans les propriétés physiques, mais surtout immunologiques et chimiques de ces isoformes, comme nous le discuterons plus loin (revue dans : d'Albis et al. 1979, Léger et al. 1975, Lompré 1982, Schwartz 1978, Schwartz et al. 1982, Squire 1981, Weeds 1978).

1.2.1. Les chaînes lourdes

L'hydrolyse enzymatique partielle a permis de préciser la structure et certaines caractéristiques fonctionnelles des chaînes lourdes. Deux sites sont particulièrement sensibles à la protéolyse, induisant la fragmentation de la protéine en trois résidus différents :

- la méromyosine légère (dimère : Mr = 140.000 à 150.000), qui correspond à la tige hélicoïdale formant le corps du filament épais, ne porte aucune activité enzymatique.

- la partie intermédiaire, S2 (dimère : Mr = 60.000 environ), présentant également un pourcentage d'hélicité de près de 90%, pourrait modifier son orientation par rapport à la méromyosine légère pour permettre à la tête de myosine de s'écarter du filament (Huxley 1969, Eliott et Offer 1978).

- la partie globulaire, S1 (Mr = 140.000 environ), correspondant à la tête de la myosine, porte le site enzymatique et le site de liaison à l'actine. C'est évidemment la sous-unité qui a fait l'objet de la majorité des travaux récents. S1 présente l'avantage, par rapport à la myosine totale, d'être soluble même à très faible force ionique, et de permettre l'étude de l'activité enzymatique dans des conditions plus proches de la physiologie que KCl 0,6 M. Suivant les conditions d'hydrolyse, sa composition varie : en absence de cations divalents, le S1 obtenu ne contient pas la chaîne légère phosphorylable (L2), et le poids moléculaire de la chaîne lourde est de 90.000 à 95.000 (Cardinaud et al. 1973, Yagi et Otani 1974, Weeds et Taylor 1975). L'hydrolyse en présence de Mg^{2+} conduit à un S1 de Mr 102.000 et la chaîne légère L2 reste associée (Cooke 1972, Yamamoto et Sekine 1980). Il est donc vraisemblable que la présence de L2 protège un site d'hydrolyse de S1. La chaîne lourde de S1 peut elle-même être fragmentée par la trypsine en trois fragments de Mr 27.000, 50.000 et 20.000 environ (Balint et al. 1978, Hozumi et Muhlrad 1981, Mornet et al. 1979a, Yamamoto et Sekine 1979a, b, c). Le fragment de Mr 27.000, N terminal, présente des propriétés de

spécificité immunologique très marquées (Schwartz et al. 1980), et contient un des sites de liaison à l'ATP (Szilagyi et al. 1979). Deux sites de liaison à l'actine, proches l'un de l'autre, sont trouvés sur les fragments de Mr 20.000 et 50.000 (Mornet et al. 1981a et b). La topographie possible du S1 est représentée figure 2.

Des études antérieures au travail présenté ici avaient révélé de petites différences de structure primaire entre les myosines squelettique rapide et lente ou cardiaque (Huszar et Elzinga 1972). La myosine cardiaque ne contient pas de 3-méthyl-histidine au contraire de la squelettique (Dreizen et Gershman 1970, Kuehl et Adelstein 1970), mais ceci n'explique pas les différences d'activité enzymatique constatées (Johnson et Perry 1970). Huszar (1975) a montré que l'enzyme méthylante n'existait pas dans le coeur. Les travaux récents qui ont permis d'isoler plusieurs isoformes de la myosine seront présentés dans la discussion.

1.2.2. Les chaînes légères

A chaque chaîne lourde de myosine, au niveau du S1, sont associées deux chaînes légères, une chaîne phosphorylable par une kinase spécifique calmoduline-dependante , et une chaîne non phosphorylable. Les chaînes légères de la myosine font partie de la famille des calciprotéines dont le représentant typique est la calmoduline. Elles ont cependant évolué, et elles ne possèdent qu'un site de fixation du Ca^{2+}, au lieu des quatre de la calmoduline.

1.2.2.1. La chaîne légère phosphorylable :

Son poids moléculaire est de 18.500 environ dans le muscle squelettique et 19.000 environ dans le coeur. Suivant les auteurs, cette sous-unité est nommée LC 20K, ML 2/3, P-LC, LC2, DTNB dans le muscle blanc (car elle peut être enlevée spécifiquement par le DTNB), ou régulatrice. Pour des raisons de simplicité, nous l'appellerons "L2" dans la suite de ce travail.

La figure 3 résume les variations de poids moléculaire observées en fonction du type de muscle (Sarkar et al. 1971). Les chaînes légères phosphorylables provenant de muscles différents présentent de grandes analogies de séquence (Léger et Elzinga 1977, Klotz et al. 1982), notamment les acides aminés vraisemblablement impliqués dans la liaison

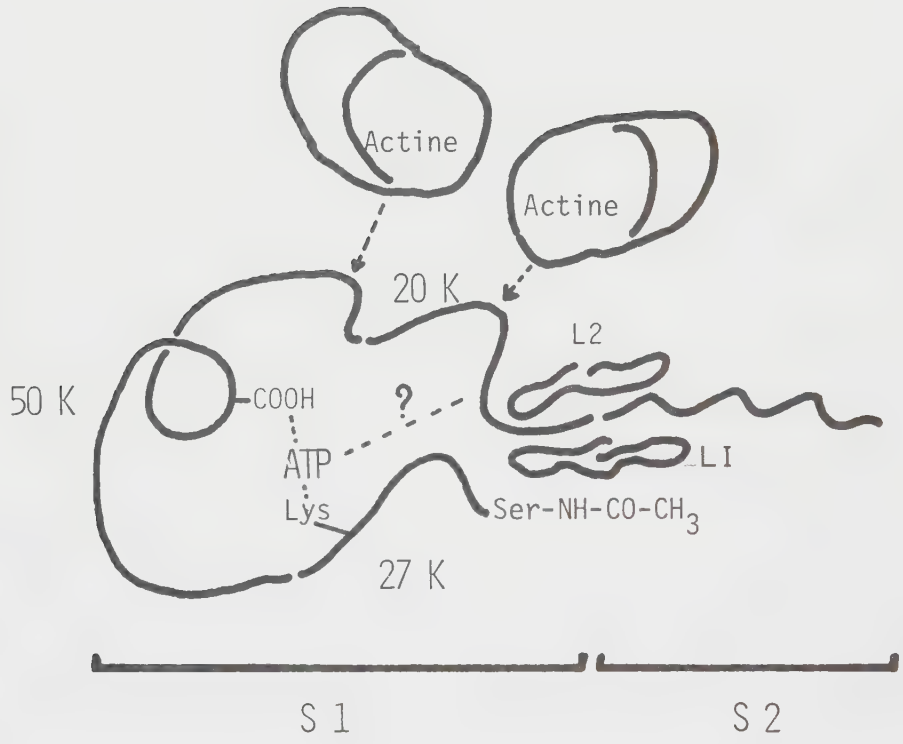


Figure 2 : Schéma fonctionnel du site actif de la myosine mettant en évidence les acides aminés impliqués dans la liaison avec le substrat. Les sites de liaison à l'actine sont également indiqués.

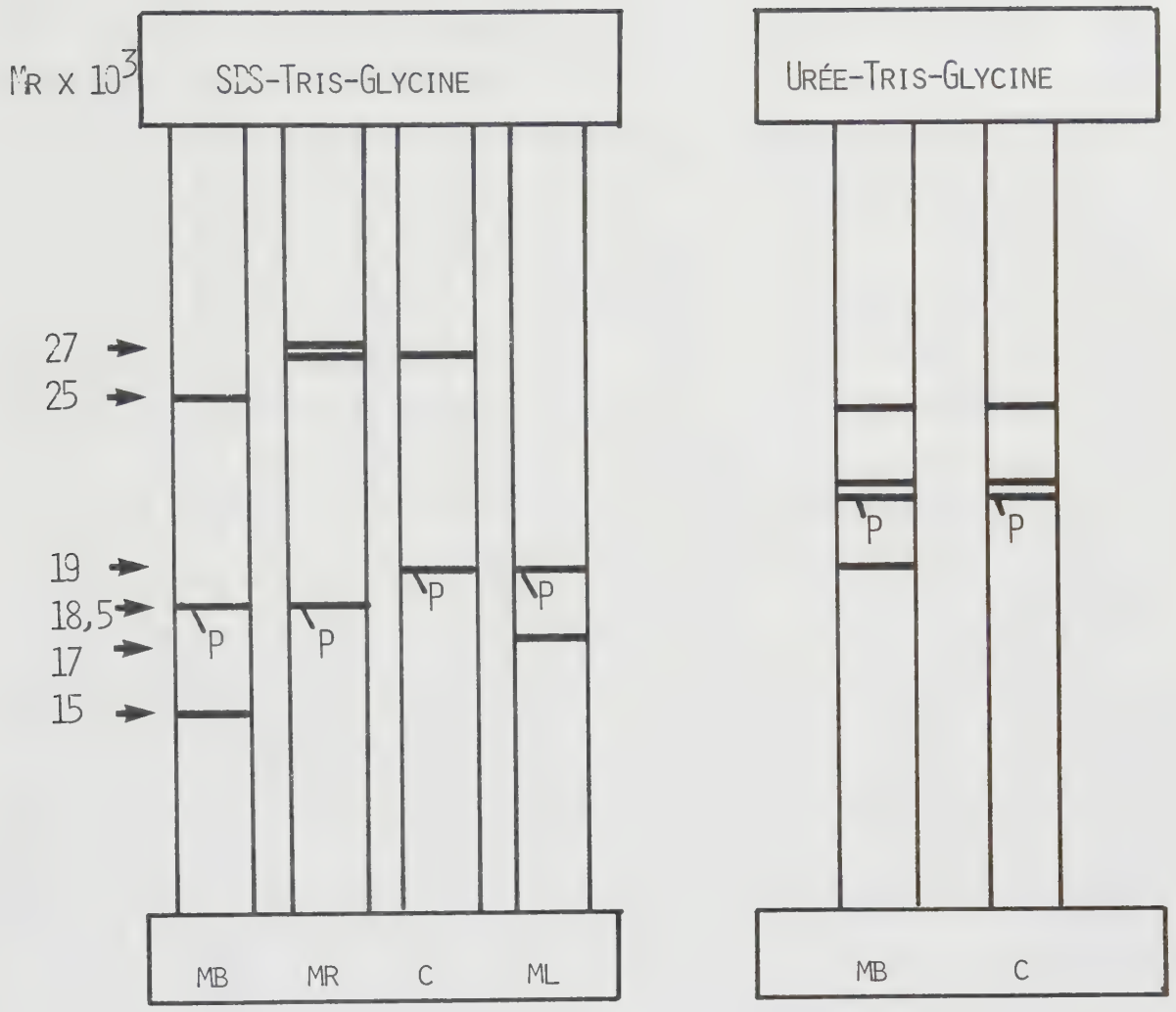


Figure 3 : Schéma de l'aspect électrophorétique des chaînes légères de myosine après électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%), en présence de SDS-tris-glycine (selon Laemmli 1970) ou d'urée-tris-glycine à pH 8,3 (selon Perrie et Perry 1970). Cette dernière technique permet de séparer les formes phosphorylée (indiquée par -P) et déphosphorylée de la chaîne légère phosphorylable. Les chaînes légères proviennent de muscle squelettique blanc rapide (MB) ou rouge lent (MR), de coeur (C) et de muscle lisse (ML) de vertébrés supérieures.

calcique (Collins 1976). La séquence complète de L2 de muscle squelettique a été effectuée par Collins (1976) et la comparaison avec la séquence des chaînes légères alcalines du même muscle (Frank et Weeds 1974) permet de conclure qu'elles ont évolué à partir d'un ancêtre commun (Collins 1976). Ceci est en accord avec l'observation de Silberstein et Lowey (1977) qui trouvent une réactivité immunologique entre les deux types de chaînes légères. La chaîne légère L2 cardiaque de poulet (Matsuda et al. 1981), de grenouille (Barany et Barany 1982), de lapin et de boeuf (Westwood et Perry 1982) existe sous deux formes, différenciées par isoélectrofocalisation, qui montrent de faibles différences de séquence (Matsuda et al. 1981, Westwood et Perry 1982). Ces deux formes, toutes deux phosphorylables, peuvent correspondre aux formes normale et satellite de L2 cardiaque observées par Frearson et Perry (1975) après électrophorèse en présence d'urée 8 M.

La chaîne légère L2, de forme allongée (Alexis et Gratzer 1978), est vraisemblablement située au niveau de la charnière S1-S2 (Weeds et Taylor 1975, Weeds et Pope 1977, Bagshaw 1977), car elle protège cette région de la protéolyse, en présence de Ca^{2+} (Higuchi et al. 1978, Weeds et Pope 1977). Cette localisation a été confirmée par microscopie électronique après marquage de L2 à l'aide d'un anticorps monoclonal (Winkelmann et Lowey 1983). Alexis et Gratzer (1978) ont proposé un mécanisme de contrôle de la charnière S1-S2 par le changement de forme de L2, induit par la fixation de Ca^{2+} à cette protéine. L'affinité de L2 pour l'ion Ca^{2+} serait diminuée par la phosphorylation (Alexis et Gratzer 1978, Kardami et Gratzer 1982), bien que ce résultat soit contesté par Holroyde et al. (1979).

L'électrophorèse en présence d'urée 8 M à pH 8,6 révèle deux formes de cette protéine que Perrie et Perry (1970) appelèrent M12 et M13. L'incubation de la myosine en présence de ^{32}P-ATP et d'une préparation enzymatique peu purifiée montrait que M12 était la forme phosphorylée de M13 (figure 3), et que l'acide aminé phosphorylé était une sérine en position 15 (Perrie et al. 1973, Collins 1976). Les proportions relatives des formes phospho- et déphosphorylée varient en fonction des conditions d'extraction (Perrie et al. 1973) et en fonction de l'espèce (Delcayre et Swynghedauw 1975), ce qui s'interprète par une variation de l'équilibre, in vitro, entre les activités kinase et phosphatase. Ceci est un point

important, car dans le but de mesurer le niveau de phosphorylation de L2 in vitro, il importe de bloquer les deux activités enzymatiques pendant l'isolement de la chaîne légère.

La chaîne légère de la myosine est phosphorylée in vivo et in vitro par sa kinase spécifique Ca^{2+}- et calmoduline-dépendante. L'étude de cette kinase est détaillée dans un des paragraphes suivants. Waisman et al. (1978) ont pu phosphoryler L2 in vitro par une kinase "multifonctionnelle", mais leur préparation contenait vraisemblablement plusieurs activités kinase (Wang et Waisman 1979). Tuazon et Waisman (1982) phosphorylent la chaîne légère de muscle squelettique à l'aide d'une kinase activée par hydrolyse trypsique, extraite des réticulocytes de lapin; cependant, l'acide aminé phosphorylé est différent de la sérine 15 phosphorylée par la myosine kinase. la kinase AMPc-dépendante phosphoryle, à une vitesse très inférieure à la normale, la chaîne légère isolée de muscle cardiaque (Reddy et al. 1977) ou de muscle lisse (Noiman 1980), mais pas la myosine de muscle lisse (Walsh et al. 1981). De même, la phosphorylation par une caséine-kinase 1, à une vitesse très faible, de la chaîne légère de muscle lisse ou squelettique a été décrite (Singh et al. 1982). Le rôle de la chaîne légère phosphorylable dans le contrôle de l'activité enzymatique est abordé dans le paragraphe 2.

1.2.2.2. Les chaînes légères non phosphorylables

Sur électrophorèse en milieu dissociant, un seul type de chaîne légère cardiaque non phosphorylable (L1 : Mr = 27.000 environ) est mis en évidence (figure 3). Cependant, Ueda et Yazaki (1981), Weeds (1976) et Pinter et al. (1981) ont séparé deux formes L1a et L1b par des techniques plus discriminantes. Dans le muscle squelettique blanc, deux types de chaînes légères sont trouvés (A1 : Mr = 25.000 et A2 : Mr = 18.500). A part la substitution de quelques acides aminés, les séquences de la partie commune aux deux chaînes sont identiques.

Le rôle des chaînes légères non phosphorylables est inconnu. Il est certain qu'elles sont reliées à S1, et on a longtemps supposé qu'elles avaient une fonction de contrôle de l'activité enzymatique. Les premières expériences de dissociation en milieu alcalin de cette chaîne de la myosine conduisaient à la perte de l'activité ATPase (Dreizen et

Gershman 1970, Weeds et Lowey 1971). Cependant, Léger et Marotte ont démontré que l'inactivation enzymatique précédait la dissociation des chaînes légères et pouvait être due à une dénaturation du S1. En effet, les chaînes légères non phosphorylables peuvent être dissociées des chaînes lourdes par NH_4Cl (Wagner et Giniger 1981) ou par chromatographie sur DEAE-cellulose à 37°C en présence d'ATP (Siravamakrishnan et Burke 1982) sans perte de l'activité ATPase. De même il a été montré que les différences de cinétique enzymatique observées entre les isoformes squelettiques S1-A1, et S1-A2 (Wagner 1977, Wagner et Weeds 1977, Weeds et Taylor 1975) disparaissent lorsque les mesures sont effectuées à force ionique faible (Pope et al. 1981) ou à 20°C en absence d'actine (Bechet et al. 1982).

1.3. L'activité ATPase

Depuis les travaux de Engelhardt et Lyubimova (1939), on sait que la myosine est une enzyme (ATP phosphohydrolase, E.C. 3.6.1.3.). La réaction s'écrit :

ATP + myosine -----> ADP + $H_2PO_4^-$ + H^+ + Q,

mais il existe plusieurs intermédiaires réactionnels et la séquence exacte des événements biochimiques n'est pas définitivement établie (voir paragraphe : mécanisme de l' ATPase). Engelhardt et al. (1941) ont également observé que l'addition d'ATP à des filaments myofibrillaires entraînait une augmentation de 50 à 100% de leur distensibilité. Ce résultat - la dissociation de l'acto-myosine - ne sera correctement interprété que plus tard, mais il avait le mérite de faire, pour la première fois, le lien entre l'hydrolyse de l'ATP et les propriétés mécaniques musculaires.

La somme des travaux récents concernant l'ATPase et son lien avec le mouvement musculaire ont abouti à des théories de la contraction d'une très grande complexité, qui remettent partiellement en question l'hypothèse du blocage stérique de l'interaction actine-myosine par la tropomyosine. L'étude de l'ATPase de la myosine a fait l'objet de nombreux travaux. Pour une revue sur ce sujet, voir Adelstein et Eisenberg (1980) et Taylor (1979).

1.3.1. Le site enzymatique

Il est certain qu'il est situé sur la chaine lourde de S_1 (Murphy et Morales 1970), mais sa structure est toujours sujette à hypothèses. Pour Mendelson et al (1973) et Elliott et Offer (1978), la forme du S_1 serait grossièrement celle d'une poire, et le site actif, dans l'hypothèse de Ramirez (1979) formerait une poche située sur le fragment 20 k.

Les travaux ayant abouti aux résultats les plus intéressants ont concerné l'identification et la localisation des acides aminés essentiels dont l'intégrité détermine l'activité enzymatique. Ces acides aminés jouent soit un rôle de maintien de la structure du site enzymatique (c'est vraisemblablement le cas pour les deux cystéines SH_1 et SH_2, longtemps considérées comme intervenant dans la réaction enzymatique (Klotz et al. 1975, Sekine et Yamaguchi 1963), soit un rôle de liaison du substrat : lysine du fragment de Mr 27.000 (Mornet et al. 1980), deux arginines non localisées (Mornet et al. 1979, Morkin et al. 1979), un carboxyle sur le fragment 50.000 (Lacombe et al. 1981, Korner : communication personnelle) dont le comportement vis à vis du substrat diffère dans la myosine squelettique ou cardiaque (Korner et al. 1982). Le schéma de la figure 2 résume ces résultats.

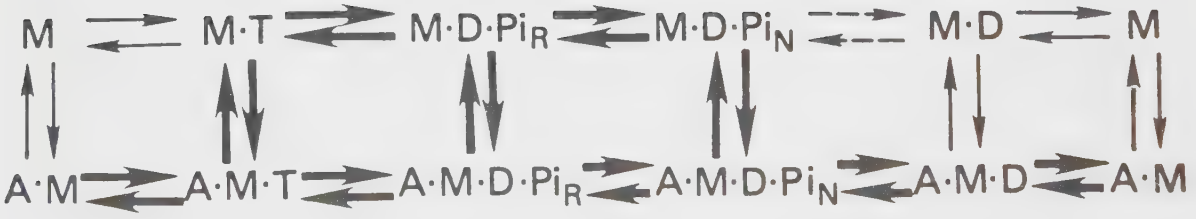
1.3.2. Le mécanisme enzymatique

La réaction catalysée par la myosine est complexe. Actuellement, un certain nombre de modèles théoriques sont proposés, qui tentent de rendre compte des résultats observés.

L'étude est évidemment plus facile si on raisonne sur la myosine pure. La réaction s'écrit (Bagshaw et Trentham 1974) comme indiqué figure 4 (A). Il est généralement admis deux changements de conformation de la myosine au cours de la réaction.

Cependant les modèles visant à décrire les étapes de la réaction telle qu'elle se déroule dans le muscle ont à répondre à un certain nombre d'exigences, dont l'intervention de l'actine dans le mécanisme. Plusieurs modèles se sont succédés, évoluant d'une réaction polarisée vers une suite d'équilibres (revue dans : Adelstein et Eisenberg 1980, Taylor E.W. 1979). La récente proposition de Stein et al. (1979), représentée en figure 4 (B) tient compte des observations suivantes :

A



B

Figure 4 : Mécanisme théorique de la réaction enzymatique catalysée par la myosine (A) ou l'actomyosine (B). Abréviations : M = myosine, A = actine, T = ATP, D = ADP, R = état réfractaire, N = état non réfractaire. (A : d'après Bagshaw et Trentham 1974; B : d'après Stein et al. 1979).

a/ l'actine stimule la myosine ATPase (Eisenberg et Moss 1968).

b/ existence d'une libération de phosphate précoce et rapide (Kinoshita et al. 1969, Lymn et Taylor 1971).

c/ existence d'une étape actine-myosine dissociées, donc d'un état de la myosine réfractaire à la liaison actine (Eisenberg et Kielley 1972).

d/ il peut y avoir hydrolyse de l'ATP sans dissociation actine-myosine (Stein et al. 1979, Mornet et al. 1981b).

Les étapes limitantes seraient les passages de la myosine ou de l'actomyosine de l'état réfractaire à l'état non réfractaire.

Comme on le voit sur ce schéma, on ignore donc quelle est la relation qui unit l'hydrolyse de l'ATP à la liaison actine-myosine. D'après les expériences de Stein et al. (1979), la myosine peut fixer l'actine, même en présence d'ATP. De même, la réversibilité de certaines étapes qui semble se dégager des travaux récents oblige à concevoir un état d'équilibre rapide entre les états liés et non liés de la myosine et de l'actine, plutôt qu'un phénomène du type tout ou rien (Adelstein et Eisenberg 1980).

1.3.3. Le contrôle de l'activité ATPase

La mesure de l'activité ATPase de la myosine est réalisée in vitro dans des conditions très différentes de celles rencontrées dans le muscle. Notamment les protéines du filament fin et l'environnement ionique modifient de manière déterminante l'activité de la myosine. Cependant, l'analyse de cette activité enzymatique impose de démonter le système pour étudier la fonction réservée à chaque composant dans l'activité physiologique.

1.3.3.1. Les protéines du filament fin

(revue dans : Léger et al. 1975, Squire 1981).

Cinq groupes de protéines sont associés dans le filament fin, comme représenté sur la figure 5:

a/ l'actine (Mr = 42.500) est une protéine globulaire (actine G) qui polymérise en présence de Mg^{2+} et ATP, pour former un double filament hélicoïdal (actine F), venant s'accrocher au niveau de la ligne Z du sarcomère. Elle a une très forte affinité pour la myosine surtout en absence d'ATP (état de rigor), et pour la tropomyosine. Six isoformes de

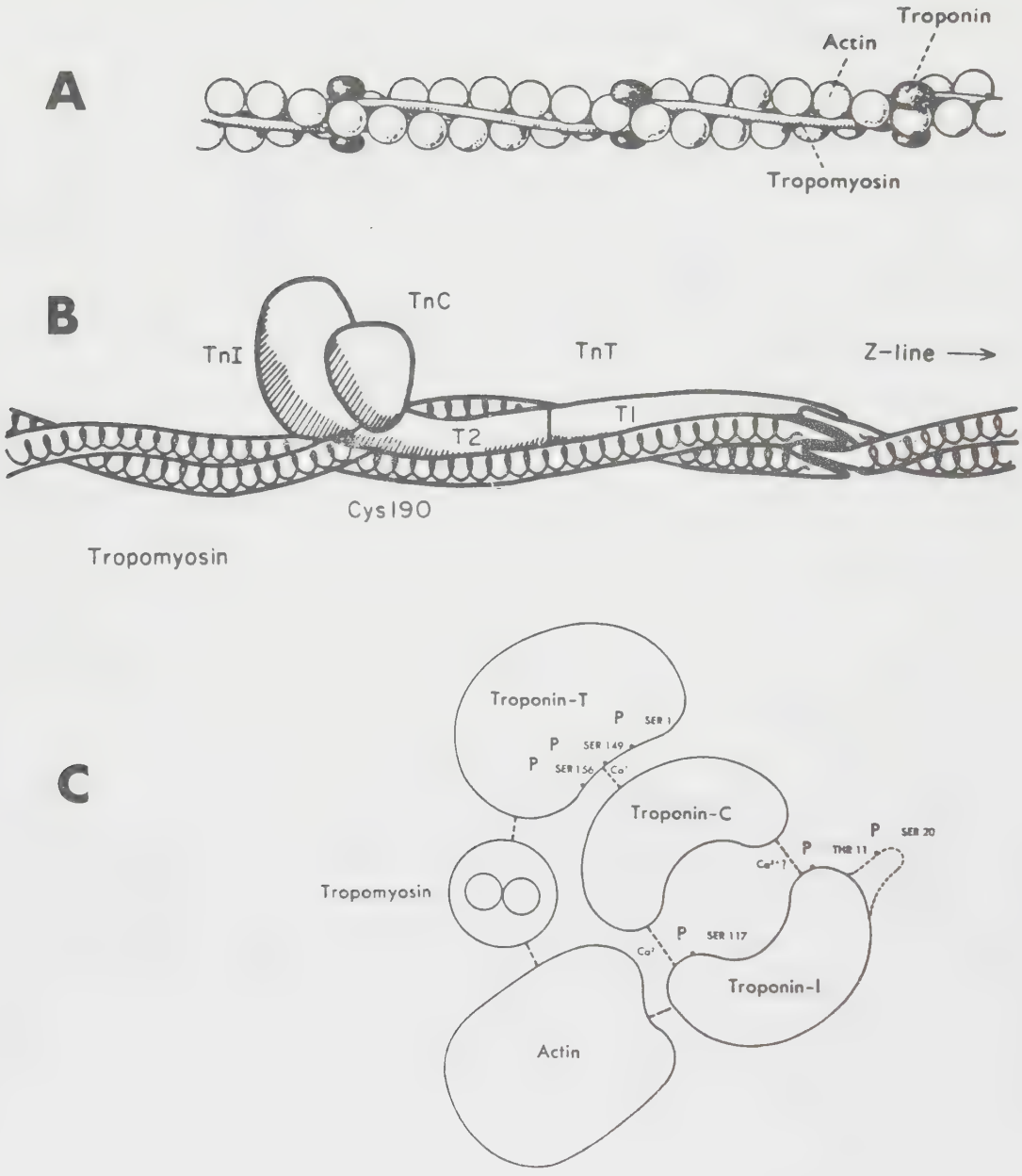


Figure 5 : A/ Modèle schématique du filament fin musculaire (d'après Ebashi 1969). B/ Modèle du complexe troponine-tropomyosine (d'après Flicker et al. 1982). C/ Schéma des interrelations existant entre les protéines du filament fin. Les relations certaines sont indiquées par les lignes pointillées. Ca^{2+} indique que la liaison nécessite ou est modifiée par cet ion. Les sites de phosphorylation sont indiquées par P (d'après Perry 1980).

l'actine ont été identifiées : actine squelettique, cardiaque, deux actines du muscle lisse, et deux actines cytoplasmiques (Morgan et al. 1980, Vandekerchkove et Weber 1979, Whalen et al. 1976, Zakut et al. 1982).

b/ la tropomyosine est un dimère hélicoïdal allongé (Mr = 2 x 35.000) disposé dans la gorge formée par les filaments d'actine. Deux isoformes α et β de la sous-unité sont connues, dont le rapport stoechiométrique dépend du type de muscle et du développement (voir Léger 1980, pour une revue).

c/ le complexe troponine comprend trois protéines associées structuralement et fonctionnellement : la troponine C (Tn C; Mr = 18.000) fixe 3 (Tn C cardiaque) ou 4 Ca^{2+} par molécule (Tn C squelettique), et sensibilise le système contractile à l'ion Ca^{2+}; la troponine I (Tn I ; Mr = 24.000 dans le coeur) inhibe l'activité ATPase de l'actomyosine , cette inhibition étant levée par la fixation de Ca^{2+} sur Tn C. Tn I cardiaque est phosphorylable par la kinase AMPc-dépendante (Bailey et Villar-Palasi 1971) avec diminution de l'affinité de Tn C - et donc du système contractile - pour le Ca^{2+} (Robertson et al. 1982); la troponine T (Tn T; Mr = 37.000 dans le coeur) fixe Tn I et Tn C sur la tropomyosine. La phosphorylation de Tn T ne modifie pas ses propriétés physiologiques (voir Berson 1979, pour une revue).

1.3.3.2. L'activité ATPase de la myosine

L'intérêt d'utiliser la myosine purifiée est d'étudier une population protéique bien définie. L'intervention des protéines régulatrices du filament fin, pour déterminante qu'elle soit dans le fonctionnement du système contractile, ne modifie pas radicalement les conclusions qui ont pu être tirées à partir de l'étude de la myosine isolée.

L'ATPase de la myosine est activée par :

- la force ionique, en absence de cations (K^+-EDTA ATPase). La myosine n'est soluble qu'à force ionique élevée (par exemple KCl 0,6 M) et il est vraisemblable que l'activation observée est due à une modification de conformation du site actif.
- L'ion Ca^{2+}, de 1 à 10 mM (Ca^{2+}-ATPase)

Elle est inhibée par :

- l'ion Mg^{2+} (Mg^{2+}-ATPase)
- l'ion Ca^{2+} > 10 mM
- l'ATP en excès
- la N-éthyl-maléimide (NEM) qui bloque le groupement SH des résidus cystéine. Il est vraisemblable que cette inhibition est due à un effet stérique de la NEM (molécule relativement grosse) puisque le blocage des mêmes résidus par l'ion cyanure (petite molécule) n'affecte pas l'activité ATPase (Wiedner et al. 1978, Botts et al. 1979).

Il est à noter que la presque totalité des mesures d'ATPase sont effectuées pendant des temps de l'ordre de 5 à 15 minutes, c'est-à-dire pendant la phase d'état stationnaire de la réaction. Or il a été montré l'existence d'une première phase de la réaction, de l'ordre de la milliseconde (Kinoshita et al. 1969), pendant laquelle la myosine hydrolyse l'ATP à grande vitesse. Il existe donc une libération précoce de phosphate, qui n'est pas mesurable par la technique classique décrite ci-dessus. Toutefois, il existe une relation entre les ATPases de la myosine mesurées pendant la phase de libération précoce de phosphate et pendant l'état d'équilibre (Van Thiem et al. 1978).

L'activité ATPase peut etre mesurée sur les produits de protéolyse de la myosine, notamment S_1, qui sont solubles à faible force ionique. Les résultats obtenus sont qualitativement identiques à ceux observés sur la myosine.

1.3.3.3. L'activité ATPase de l'actomyosine et des myofibrilles

L'addition d'actine F modifie considérablement les propriétés de l'ATPase de la myosine : elle active notamment de 100 à 200 fois la Mg^{2+}-ATPase de la myosine à faible force ionique (Eisenberg et Moss 1968). Cette activité est souvent considérée comme plus proche de la réalité musculaire que celle de la myosine pure, mais il est plus difficile d'obtenir une préparation reproductible. Pour des concentrations calciques inférieures à 10^{-7} M, l'ATPase des myofibrilles est totalement inhibée par la troponine I. Nous reviendrons sur ce mécanisme dans un paragraphe prochain. Le tableau I a pour but de faire le point sur les renseignements apportés par les différentes préparations que nous venons de décrire.

TABLEAU I — Mesures de l'ATPase : les différentes préparations

Préparation	Conditions du dosage (Force ionique/ activateurs)	Avantages, signification	Inconvénients
Myosine		- Protéine pure : variation d'ATPase imputables uniquement à la myosine	
	Faible/Ca^{2+}	- Ca^{2+}-ATPase = index le plus utilisé de la performance contractile	Insuffisant pour décrire le système et notamment l'interaction avec l'actine
	Forte/K^{+}, EDTA	- K^{+}-EDTA ATPase = index de l'intégrité des groupements SH	
	Faible/Mg^{2+}	- Mg^{2+}ATPase = test de pureté	
	Faible/actine	- Etude de l'interaction actine-myosine	
Actomyosine	Faible/Ca^{2+},Mg^{2+}	- voir myosine ATPase activée par actine	- protéolyse et contamination par d'autres ATPases non exclues
Myofibrilles	Faible/Ca^{2+}, Mg^{2+}	- la plus physiologique, si lavée au triton (élimine les membranes)	- contamination par sarcolemne, reticulum sarcoplasmique et mitochondries

(D'après Scheuer et Bhan 1979)

1.4. La contraction

1.4.1. Modèles théoriques

Le modèle maintenant classique du blocage stérique (Haselgrove 1972, Huxley 1972, Potter et Gergely 1974) fait jouer à la tropomyosine le rôle d'un verrou empêchant l'interaction actine-myosine à l'état de relaxation (figure 6,A). La fixation du Ca^{2+} sur TnC modifie la conformation de cette protéine, ce qui entraîne un réarrangement du complexe troponine-tropomyosine et le déplacement de la tropomyosine vers la gorge formée par les deux filaments d'actine. L'interaction actine-myosine est alors possible (figure 6,B). Cependant ce modèle est remis en question par les reconstitutions tridimensionnelles à partir de filaments d'actine décorés par S_1 de Seymour et O'Brien (1980) d'après des observations de Moore et al. (1970), qui confèrent à la tropomyosine une position très différente de celle prévue par le modèle du blocage stérique. Taylor et Amos (1981) confirment cette nouvelle position de la tropomyosine, mais proposent un autre modèle de blocage stérique de l'interaction S_1-actine par la tropomyosine. Récemment Amos et al. (1982) ont affiné ce modèle (figure 6,C) en tenant compte de deux sites de fixation de S_1 à l'actine découverts par Mornet et al. (1891a) et confirmés par eux. La figure 6,C représente les interactions probables entre une molécule de S_1 et deux actines consécutives (contacts 1 et 2) à l'état de rigor. La tropomyosine, dans ces conditions, est située près de la gorge formée par les deux actines et s'éloignerait de cette position pour empêcher l'interaction actine-S_1 à l'état relâché (non représenté). En conclusion, le modèle du blocage stérique peut correspondre, dans son principe, à la réalité. Il impose toutefois un certain nombre de caractéristiques cinétiques à l'interaction actine-myosine, dont certaines sont contredites par l'expérimentation (Bremel et al. 1972, Chalovich et Eisenberg 1982, Eaton et al. 1975, Yang et al. 1977). L'ensemble de ces travaux suggère que le couple troponine-tropomyosine peut induire indirectement une modification de la configuration stérique de l'actine, qui déterminerait sa capacité à interagir avec la myosine (Adelstein et Eisenberg 1980).

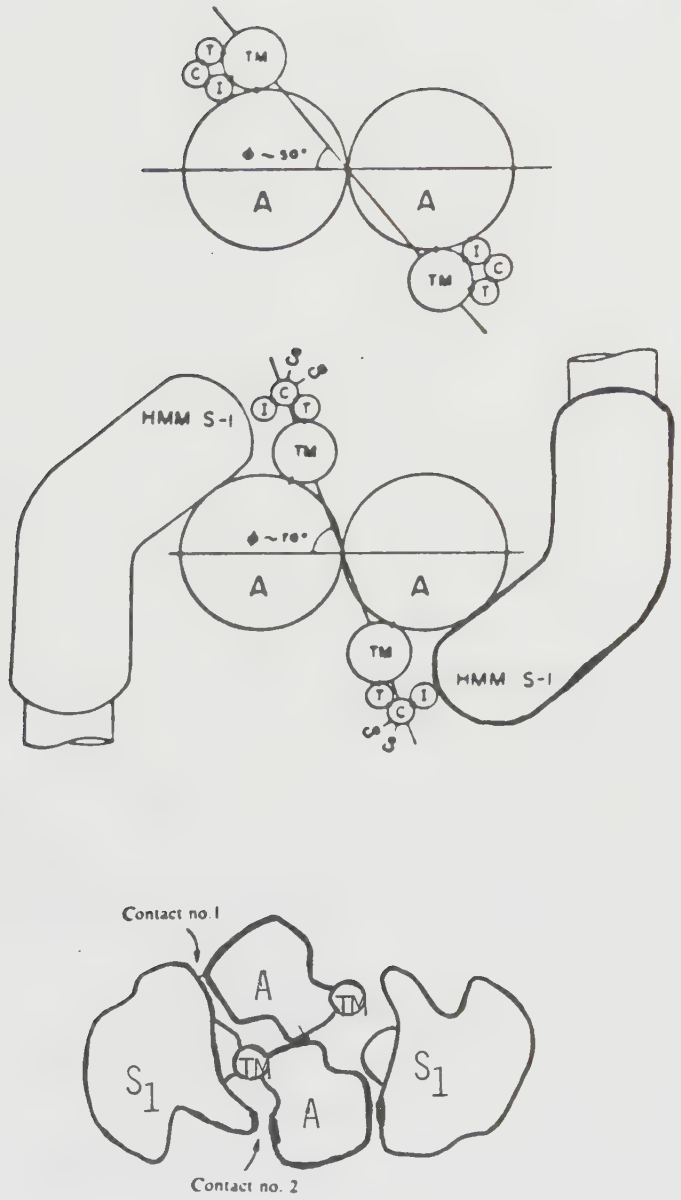


Figure 6 : Modèles de contraction. A et B/ modèle du blocage stérique (d'après Potter et Gergely 1974); A : actine, TM : tropomyosine, T,C,I : respectivement, troponine T, C et I. (A) = état relâché, (B) = état contracté. C/ modèle de Amos et al. (1982) représentant les interactions actine-S_1 à l'état de rigor.

1.4.2. Mécanisme biochimique

1.4.2.1. Le rôle de l'ion calcium

Malgré la grande affinité de l'actine pour la myosine et la présence dans le muscle relaxé de quantités suffisantes d'ATP et de Mg^{2+} pour déclencher la contraction, celle-ci n'a lieu qu'après l'arrivée d'un signal approprié, matérialisé par l'ion Ca^{2+}. On sait depuis Ringer (1883) que la contraction cardiaque ne peut avoir lieu si le milieu extracellulaire ne contient pas de Ca^{2+}. On sait également que le Ca^{2+} active le système myofilamentaire (Ebashi et al. 1969, Weber et al. 1963, Weber et al. 1964). La relation qui unit la concentration calcique à l'ATPase myofibrillaire est représentée figure 7. Cette courbe a été tracée en utilisant une préparation de fibres glycérinées qui permet, en rendant le sarcolemne perméable, de connaître et contrôler la concentration en Ca^{2+} libre intracellulaire.

La séquence des événements conduisant de l'influx calcique au glissement des filaments est connue dans ses grandes lignes. Un certain nombre de faits restent inconnus comme, par exemple, la répartition de l'ion Ca^{2+} entre les différentes protéines intracellulaires. Les études de liaison du calcium sont faites in vitro, sur des systèmes purifiés, ce qui élimine les phénomènes de compétition entre les récepteurs calciques intracellulaires; d'autre part, les constantes de liaison calcique de Tn C sont différentes lorsque la mesure est effectuée sur la protéine isolée ou en liaison avec d'autres protéines, et notamment l'actine (Kerrick et al. 1980, Potter et al. 1982). Compte tenu de ces réserves, on admet actuellement, pour l'activation contractile cardiaque, le schéma suivant :

1/ Le potentiel d'action membranaire entraine la pénétration du Ca^{2+} dans le cytoplasme (revue dans : Coraboeuf 1978). Il a été montré que la pointe du potentiel d'action, inhibée par la tétrodotoxine, est due à un courant entrant sodique rapide, tandis que le plateau, inhibé par le manganèse, serait dû majoritairement à un courant entrant calcique plus lent (Coraboeuf et Vassort 1968). La mesure directe des courants ioniques transmembranaires, par la technique du potentiel imposé avec double partition de sucrose, a confirmé ces observations et révélé la participation d'un faible courant lent sodique dans le maintien du plateau du potentiel d'action (Rougier et al. 1969). L'intensité du courant

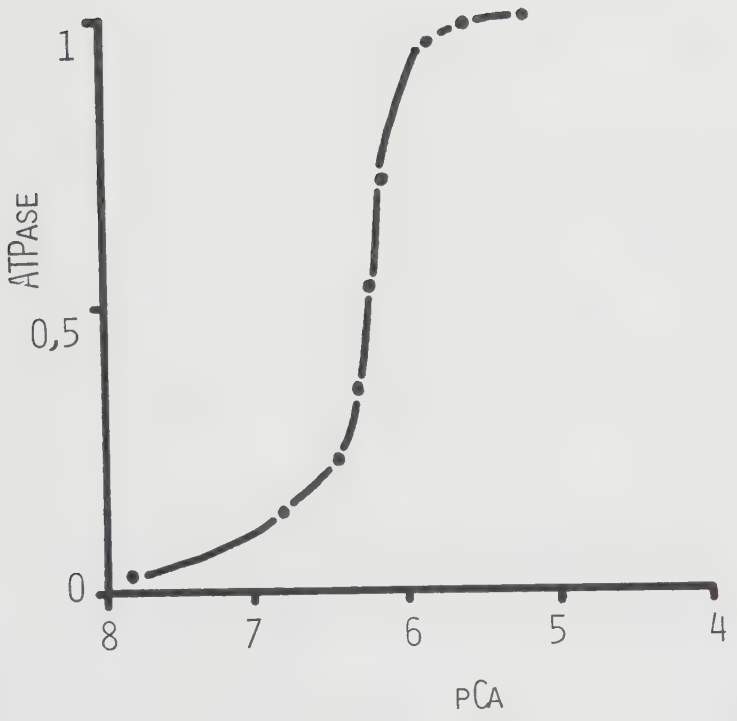


Figure 7 : Variation de l'ATPase myofibrillaire en fonction de la concentration en calcium (d'après Hellam et Podolsky 1969).

entrant calcique, déterminée par les valeurs du gradient de concentration calcique transmembranaire et du potentiel membranaire, varie en fonction de la taille de l'espèce animale. En effet, le plateau du potentiel d'action cardiaque est plus court chez le rat que chez le lapin (Coraboeuf 1970). La concentration intracellulaire en Ca^{2+} ionisé, de l'ordre de 10^{-8} M au repos (Gillis 1977) augmente très rapidement pour atteindre environ 10^{-5} M. L'évolution de la concentration calcique intracellulaire peut être suivie grâce à des marqueurs luminescents comme l'aequorine (Allen et Blinks 1978, Blinks et al. 1976, Fabiato 1981). Bien que la quantité de Ca^{2+} entrant dans la cellule soit théoriquement suffisante pour activer les myofibrilles, un phénomène de libération autocatalytique de Ca^{2+} à partir du reticulum sarcoplasmique, déclenché par le courant entrant calcique, semble nécessaire pour activer le système myofibrillaire (Fabiato et Fabiato 1977). L'importance de ce phénomène dans le coeur varie également en fonction de l'espèce animale : les petites espèces, comme le rat, possèdent un système de libération calcique à partir du reticulum sarcoplasmique plus développé et dont le seuil d'activation par le calcium est plus faible que les grosses espèces (Fabiato et Fabiato 1978). Pour une même espèce, ce système est plus développé dans l'oreillette que dans le ventricule (Fabiato et Fabiato 1978). Toutes ces observations concordent et permettent de penser qu'un courant calcique faible est associé à une libération calcique à partir du reticulum sarcoplasmique importante.

2/ Le Ca^{2+} se fixe sur les trois sites calciques de Tn C. Deux de ces sites, qui lient également le Mg^{2+} présentent une haute affinité pour Ca^{2+} ($Ka = 3.10^{8}\ M^{-1}$), tandis que le troisième, spécifique de Ca^{2+}, possède une affinité plus faible ($Ka = 2.10^{6}\ M^{-1}$) et est le seul site responsable de l'activation myofibrillaire (Holroyde et al. 1980, Zot et Potter 1982). Solaro et al. (1974) ont calculé que 90% de la force contractile cardiaque résultait de la liaison à Tn C de 27 µmol de Ca^{2+}/kg de muscle. La force maximale est obtenue après la liaison supplémentaire de 65 µmol Ca^{2+}/kg. La fixation de Ca^{2+} sur Tn C entraîne une série de mouvements transconformationnels (décrits ci-dessus) aboutissant à l'activation de l'ATPase de l'actomyosine (Ebashi et Endo 1968) et au glissement des filaments.

3/ La relaxation est secondaire à la baisse de la concentration calcique intracellulaire à son niveau de repos (10^{-8} M). Le Ca^{2+} est séquestré activement par la pompe membranaire du reticulum sarcoplasmique, activable par phosphorylation (voir ci-dessous). Le retour à l'état de repos est assuré par un mécanisme d'évacuation du calcium en échange de sodium, dont le moteur est le gradient de concentration sodique transmembranaire. Cet échange est électroneutre (2 Na^+/1 Ca^{2+}) pour Reuter (1974) et électrogénique (3 ou 4 Na^+/1 Ca^{2+}) pour Horackova et Vassort (1976).

L'activation calcique de la contraction que nous venons de décrire schématiquement dans le muscle cardiaque procède du même mécanisme dans le muscle squelettique strié. Les différences majeures sont : 1/ le système autocatalytique de libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique existe mais son rôle n'est pas connu 2/ la Tn C squelettique comporte un site calcique spécifique supplémentaire, 3/ la Tn I squelettique n'est pas phosphorylable et 4/ la myosine est différente.

1.4.2.2. Le contrôle de la contraction cardiaque

Le mécanisme de couplage excitation-contraction possède la double propriété d'un interrupteur et d'un potentiomètre. C'est-à-dire que la contraction est déclenchée par le Ca^{2+}, mais également modulée dans son amplitude, sa vitesse de montée, etc..., par une série de mécanismes de contrôle.

1/ Le courant entrant calcique lent est augmenté par phosphorylation par la kinase AMPc-dépendante d'une protéine membranaire de Mr 23.000, la calciductine, ce qui explique l'effet inotrope positif de l'adrénaline (Rinaldi et al. 1981).

2/ La libération calcique du reticulum sarcoplasmique induite par le calcium n'est pas un phénomène du type tout ou rien, mais dépend de la charge calcique du reticulum sarcoplasmique et de la vitesse d'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire (Fabiato et Fabiato 1978).

3/ England (1975) a montré que la phosphorylation de la troponine I était reliée à la force développée par le coeur, et il a été montré (Stull et Buss 1977) que cette phosphorylation était catalysée par la kinase AMPc-dépendante. La phosphorylation de Tn I résulte en une diminution de

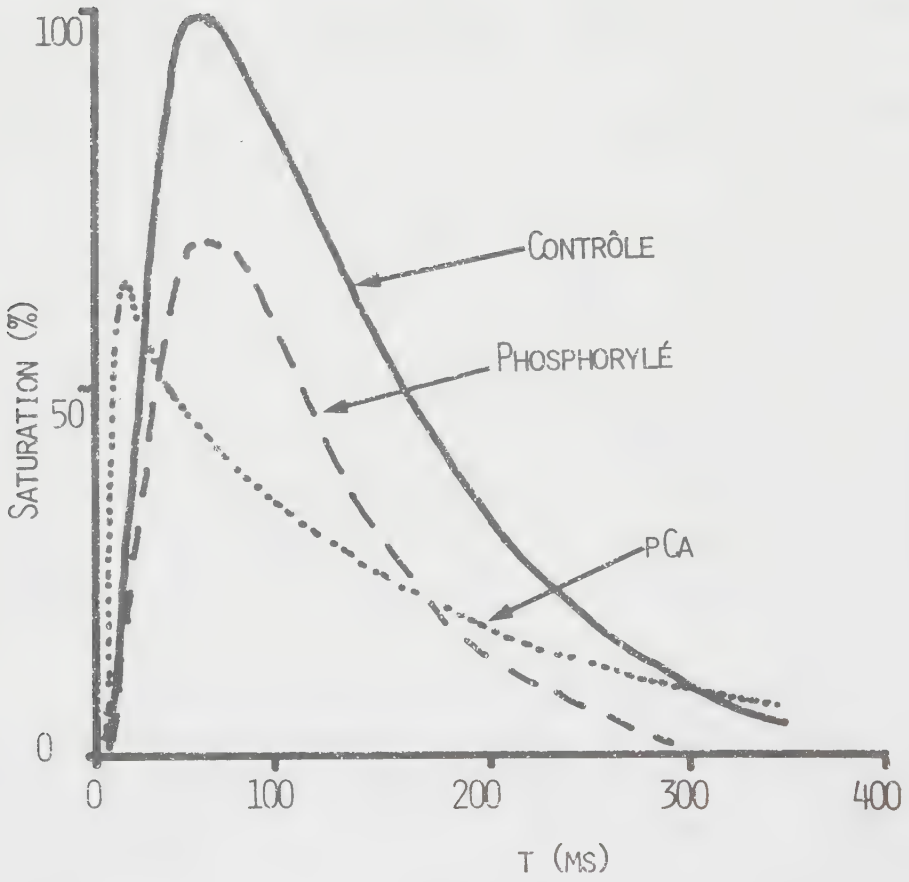


Figure 8 : Effet de la phosphorylation de TnI sur la liaison de Ca^{2+} à TnC. La cinétique de cette liaison a été calculée à partir de mesures de charges calciques sur troponine totale cardiaque dont le site Ca^{2+}-spécifique de TnC est marqué par une sonde fluorescente. pCa part de 8 pour atteindre un minimum de 5,7 à 26 mS (d'après Robertson et Potter 1982).

la sensibilité du système myofibrillaire au Ca^{2+} (Holroyde et al. 1979). La figure 8 montre que c'est l'affinité du site calcique spécifique de Tn C pour le Ca^{2+} qui est diminuée par la phosphorylation de Tn I. C'est un autre niveau d'action des catécholamines sur la contractilité cardiaque, puisque la vitesse de liaison du Ca^{2+} à Tn C serait le facteur principal déterminant la vitesse de montée en pression ventriculaire (dP/dt).

4/ Le Ca^{2+} est séquestré activement par le reticulum sarcoplasmique. L'ATPase responsable de cette séquestration est sous un contrôle complexe et sa capacité de pompage est augmentée par phosphorylation du phospholambane de la membrane du reticulum sarcoplasmique, déclenchée par le Ca^{2+} et la calmoduline (Bilezidjian et al. 1981, Le Peuch et al. 1979) et l' AMPc (Le Peuch et al. 1979, Tada et al. 1974). La stimulation du pompage calcique par le reticulum sarcoplasmique a donc pour résultat d'accélérer la relaxation cardiaque.

5/ L'exclusion du Ca^{2+} par la pompe calcique ATP-dépendante du sarcolemne est augmentée par phosphorylation par une kinase Ca^{2+}- et calmoduline-dépendante (Caroni et Carafoli 1981).

6/ La contractilité de la fibre cardiaque peut être modifiée à long terme par variation de l'ATPase de la myosine, comme discuté plus loin.

7/ Enfin le rôle de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine et son rapport avec la contractilité seront abordés dans la suite de ce travail.

1.5. Relation entre ATPase de la myosine et propriétés contractiles

1.5.1. Les variations de l'ATPase de la myosine

Les mesures d'activité ATPase de la myosine se signalent par la diversité des conditions employées par les auteurs. Les comparaisons sont donc difficiles, mais il est néanmoins possible de conclure que les muscles ne sont pas tous dotés de la même activité myosine ATPase : Brahms et Kay (1963), Barany et al. (1964) trouvent que l'ATPase de la myosine cardiaque est inférieure à celle du muscle squelettique; Bendall (1964) observe deux grands types de mammifères : les petits (rat et lapin) dont l'ATPase de la myosine squelettique est forte, et les gros (porc,

mouton, boeuf) dont l'ATPase de la myosine est plus faible. Un essai de systématisation est fait par Bendall qui observe une relation fruste, mais intéressante, entre l'énergie libérée par le muscle, et l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. C'est Barany (1967) qui va montrer le rôle déterminant de la myosine ATPase sur les propriétés contractiles du muscle.

1.5.2. La contractilité musculaire

Les muscles ont des caractéristiques contractiles variées. Hill (1938) a établi une relation entre la charge à laquelle un muscle est soumis, c'est-à-dire la tension qu'il peut développer, et la vitesse de raccourcissement initiale de la fibre. La tension maximum développée (P_o) dépend de la longueur initiale à partir de laquelle le muscle se raccourcit, ce qui se traduit par une série de courbes en fonction des différentes longueurs initiales (figure 9). Lorsque la charge imposée diminue, la vitesse de raccourcissement augmente, et l'extrapolation à l'absence de charge (c'est-à-dire en supprimant la charge du muscle lui-même) donne la vitesse initiale de racourcissement à charge nulle (Vmax) qui est indépendante de la longueur initiale. Vmax (qui ne doit pas être confondue avec une activité enzymatique) exprime donc la contractilité intrinsèque de la fibre musculaire. Ces courbes de contractilité sont applicables au coeur (Sonnenblick 1962), et la technique classique consiste à effectuer les mesures sur le muscle papillaire, qui a une forme de fuseau et peut être saisi aux extrémités. Il est à noter que la valeur de la Vmax, invariable pour des longueurs initiales différentes (mais cependant physiologiques) est modifiée par les agents inotropes négatifs (diminution) et positifs (augmentation). La démonstration de la validité de Vmax comme critère de contractilité cardiaque a fait l'objet de nombreux travaux. Parmi les principaux : Brutsaert et al. 1971a, 1971b, Brutsaert et Sonnenblick 1974, Brutsaert et Paulus 1977, Lecarpentier et al. 1982, Sonnenblick 1962.

L'interprétation de ces courbes de contractilité en termes biochimiques se fait ainsi (Huxley 1957) : à une augmentation du nombre de ponts actine-myosine correspond une augmentation de la force développée, le point P_o représentant un optimum; à une augmentation de la longueur initiale (de la précharge cardiaque) correspond une diminution du nombre

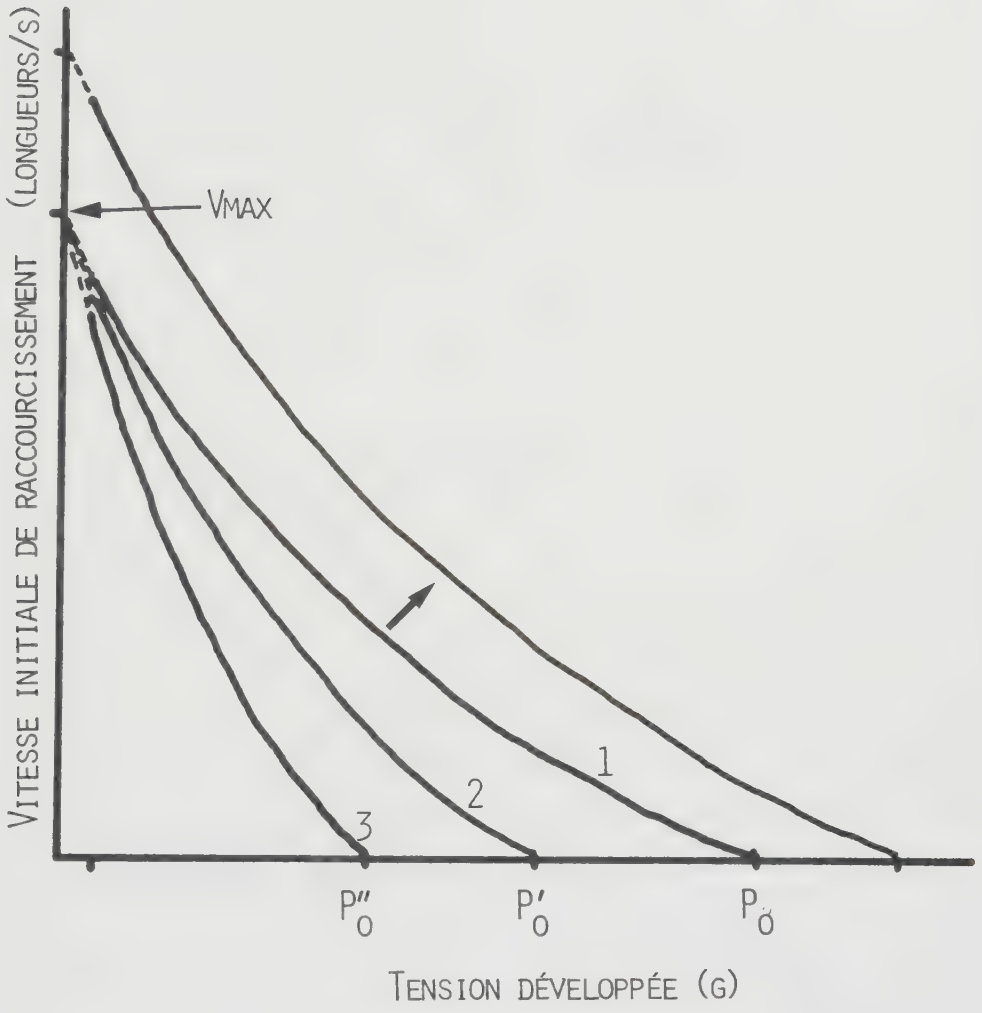


Figure 9 : Courbes tension-vitesse obtenues pour diverses longueurs initiales (ou précharges pour le coeur) décroissant de 1 à 3. La tension développée est égale à la charge (post charge pour le coeur) que le muscle doit déplacer et s'exprime en g. P_o est la tension maximale isométrique développée par le muscle. La flèche indique l'effet d'un agent inotrope positif sur la courbe 1.

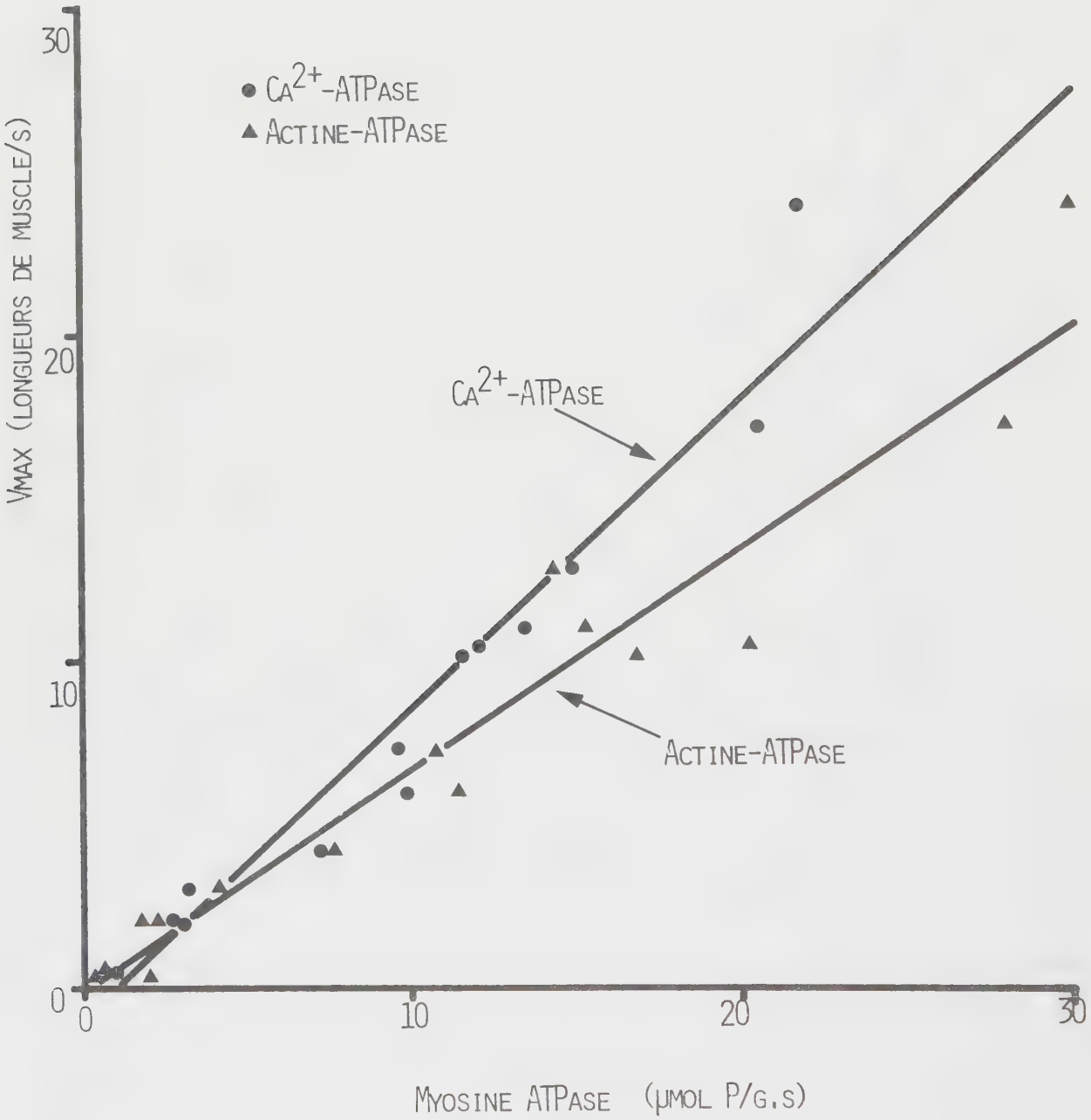


Figure 10 : Relation entre l'ATPase de la myosine activée par le Ca^{2+} ou l'actine et la Vmax, dans différents muscles squelettiques (d'après Barany 1967).

des ponts actine-myosine et donc une diminution de la force développée.

Barany (1967) a mesuré l'activité myosine ATPase activée par le Ca^{2+} ou l'actine de divers muscles squelettiques chez 14 espèces animales (vertébrés et invertébrés) et a montré qu'elles étaient corrélées avec les mesures de Vmax effectuées sur ces muscles par d'autres auteurs (figure 10). Ceci suggère que l'activité enzymatique de la myosine est un paramètre qui joue un rôle important dans la détermination de la contractilité. L'implication est qu'une variation significative et durable de l'ATPase de la myosine doit être associée à un changement, dans le même sens, de la contractilité de ce muscle, et vice versa.

2. LA PHOSPHORYLATION DE LA CHAINE LEGERE DE LA MYOSINE

Les mécanismes possibles de contrôle de l'activité ATPase de la myosine peuvent être classés selon leur niveau d'action : transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Les mécanismes transcriptionnels pouvant expliquer les variations d'activité enzymatique de la myosine seront décrits dans la discussion. La seconde partie de ce travail concernera l'étude d'une modification post-transcriptionnelle affectant la chaîne légère phosphorylable de la myosine. Il a été montré dans le paragraphe consacré à la myosine que la chaîne de Mr 20.000 environ existait sous une forme phosphorylée ou déphosphorylée. Ce paragraphe est destiné à présenter le système de phosphorylation de la chaîne légère de myosine des muscles lisse et striés de vertébrés supérieurs.

2.1. La myosine kinase

Nous appellerons cette enzyme, classiquement dénommée "kinase des chaînes légères de la myosine" (ou en anglais abrégé MLCK) dans la littérature (voir Walsh 1981, pour une revue) myosine kinase (MK), puisqu'il est établi que la chaîne légère L2 est la seule sous-unité phosphorylable de la myosine de vertébré supérieur (Léger et al. 1980).

On peut schématiquement résumer les premières étapes, qui ont abouti à la préparation de la myosine kinase et à la compréhension partielle de

son rôle dans le contrôle de la contraction :

1973 : - Adelstein et al. : La chaîne légère L2 est phosphorylée par un extrait cellulaire peu purifié de plaquettes humaines.

- Perrie et al. : L2 est phosphorylée dans le muscle squelettique de lapin.

1974 : - Pires et al. : Purification partielle de myosine kinase de muscle squelettique.

1975 : - Adelstein et Conti : La phosphorylation de l'actomyosine plaquettaire stimule 4 fois son activité ATPase.

1976 : - Aksoy et al. : La phosphorylation de la myosine de gésier dépend de la concentration calcique.

- Daniel et Adelstein : Purification de myosine kinase Ca^{2+}-dépendante de plaquettes (Mr = 83.000)

- Frearson et al. : Activité myosine kinase estimée dans les homogénats de muscle squelettique rapide et lent, lisse et cardiaque (par ordre décroissant d'activité).

1977 : - Dabrowska et al. : Purification de myosine kinase Ca^{2+}-dépendante de gésier (Mr = 105.000 + 17.000).

- Mikawa et al. : Premiers doutes sur le rôle de la phosphorylation de L2 dans le contrôle de l'ATPase de l'actomyosine de muscle lisse.

- Pires et Perry : Purification de myosine kinase Ca^{2+}-dépendante de muscle squelettique (Mr = 77.000).

- Yazawa et Yagi : La myosine kinase de muscle squelettique contient une protéine de Mr = 20.000 qui lie le Ca^{2+}.

1978 : - Dabrowska et al. : Identification de la calmoduline comme composant de la myosine kinase de muscle lisse.

- Barylko et al., Yagi et al. : Même observation sur la myosine kinase de muscle squelettique.

- Bremel et Shaw : Observation de la perte de la Ca^{2+}-dépendance de la myosine kinase.

- Adelstein et al. : La phosphorylation de la myosine kinase de muscle lisse par la kinase AMPc dépendante diminue son activité de 50% environ.

1979 : - Walsh et al. : Première purification de myosine kinase cardiaque Ca^{2+} et calmoduline-dépendante.

La myosine kinase a été purifiée partiellement ou isolée à partir de nombreux tissus musculaires striés ou lisses et non musculaires : le muscle squelettique de lapin (Nairn et Perry 1979, Pires et Perry 1977, Yazawa et Yagi 1978), le coeur de boeuf (Walsh et al. 1979, Wolf et Hofmann) et de chien (Rappaport et Adelstein et al. 1980), le gésier de poulet (Dabrowska et al. 1977, Uchiwa et al. 1982), le gésier de dinde (Adelstein et al. 1978, Adelstein et Klee 1981), l'estomac de boeuf (Walsh et al. 1982 b), l'aorte de boeuf (Di Salvo et al. 1981, Vallet et al. 1981), les plaquettes (Daniel et Adelstein 1976, Dabrowska et Hartshorne 1978, Hathaway et al. 1981). Dans tous les cas, l'enzyme active est composée de deux sous-unités : l'apoenzyme d'un Mr de 65.000 à 155.000, et une protéine d'un Mr de 16.500, la calmoduline, qui lui confère sa Ca^{2+}-dépendance (revue dans Walsh 1981).

2.1.1. La calmoduline (CaM)

Découverte par Cheung (1970) et Kakiuchi et Yamazaki (1970) comme un activateur de la phosphodiestérase, cette protéine est maintenant reconnue comme un des principaux membres de la famille des calciprotéines et participe, à ce titre, à l'expression intracellulaire des effets de l'ion Ca^{2+}. Un grand nombre de revues récentes ont été consacrées à ce rôle de la calmoduline dans la cellule (Cheung 1980a, 1980b, 1982, Klee et al. 1980, Means et Dedman 1980, Watterson et Vincenzi 1980).

2.1.1.1. Distribution

L'adjectif ubiquitaire qui accompagne fréquemment la calmoduline dans la littérature est justifié puisqu'elle existe dans tous les types de tissus et espèces eucaryotes explorés à des concentrations élevées (revue dans Klee et al. 1980). Le cerveau et le testicule en sont particulièrement riches et sont les sources privilégiées de calmoduline. L'organe-source a en effet peu d'incidence sur l'expérimentation dans la mesure où la structure primaire de la calmoduline est une des plus conservées que l'on connaisse. Depuis la découverte des parvalbumines (Pechère et al. 1971), la famille des calciprotéines s'est agrandie et forme un groupe de protéines relativement homogène présentant des analogies de structure et notamment 1 à 4 sites de liaison calcique en forme de "main E-F", d'après l'appellation de Kretsinger et Barry (1975).

L'étude de la séquence des calciprotéines (parvalbumines, calmoduline, troponine C, chaînes légères de la myosine, calciprotéines du cerveau et de l'intestin) permet de conclure qu'elles ont toutes évolué, par double duplication du gène original, à partir d'un ancêtre commun d'environ 40 acides aminés (Goodman et al. 1979). La mesure du taux de substitution des codons de la calmoduline montre qu'elle est le plus proche représentant actuel de cette protéine-souche (figure 11). Cette très faible évolution de la calmoduline en fonction du temps, de l'espèce ou du tissu, est très en faveur d'un rôle biochimique a/ fondamental, b/ similaire dans tous les tissus et c/ impliquant la structure entière de la protéine.

La localisation intracellulaire de la calmoduline montre qu'elle est associée à de nombreux systèmes, au niveau du cytosol, du noyau, des mitochondries et de la membrane. Dans le muscle squelettique, elle est révélée par immunofluorescence au niveau de la bande I de l'appareil myofibrillaire (Harper et al. 1980).

2.1.1.2. Propriétés physico-chimiques

Sa séquence représentée figure 12, a été décrite par Watterson et al. (1980) et correspond à un poids moléculaire de 16.790. La composition en acides aminés se caractérise par l'absence de cystéine, et d'hydroxyproline, ce qui lui confère une structure susceptible de déformation. L'absence de tryptophane et le rapport phenylalanine/tyrosine élevé sont la cause d'un spectre d'absorption en ultra-violet caractéristique, et d'un $\mathcal{E}\,^{1\%}_{276}$ de seulement 1,8 (Watterson et al. 1976). Environ 25% des résidus sont les acides glutamique ou aspartique, dont les groupements COOH participent à la liaison du calcium; le point isoélectrique est de 4,3. La lysine en position 115 est triméthylée, mais cette modification ne semble pas avoir de signification fonctionnelle (Molla et al. 1981).

Les quatres sites de liaison calcique présentent des analogies de séquence telles qu'on peut conclure qu'ils sont le résultat d'une double réplication du gène original. L'ion Ca^{2+} se fixe aux quatre sites avec une haute affinité, dans l'ordre suivant : site 2,1,3 et 4 (Haiech et al. (1981). Ces auteurs montrent que l'ion K^{+} peut entrer en compétition avec l'ion Ca^{2+} pour les sites récepteurs de la calmoduline, bien qu'ayant une affinité moindre, car sa concentration intracellulaire est

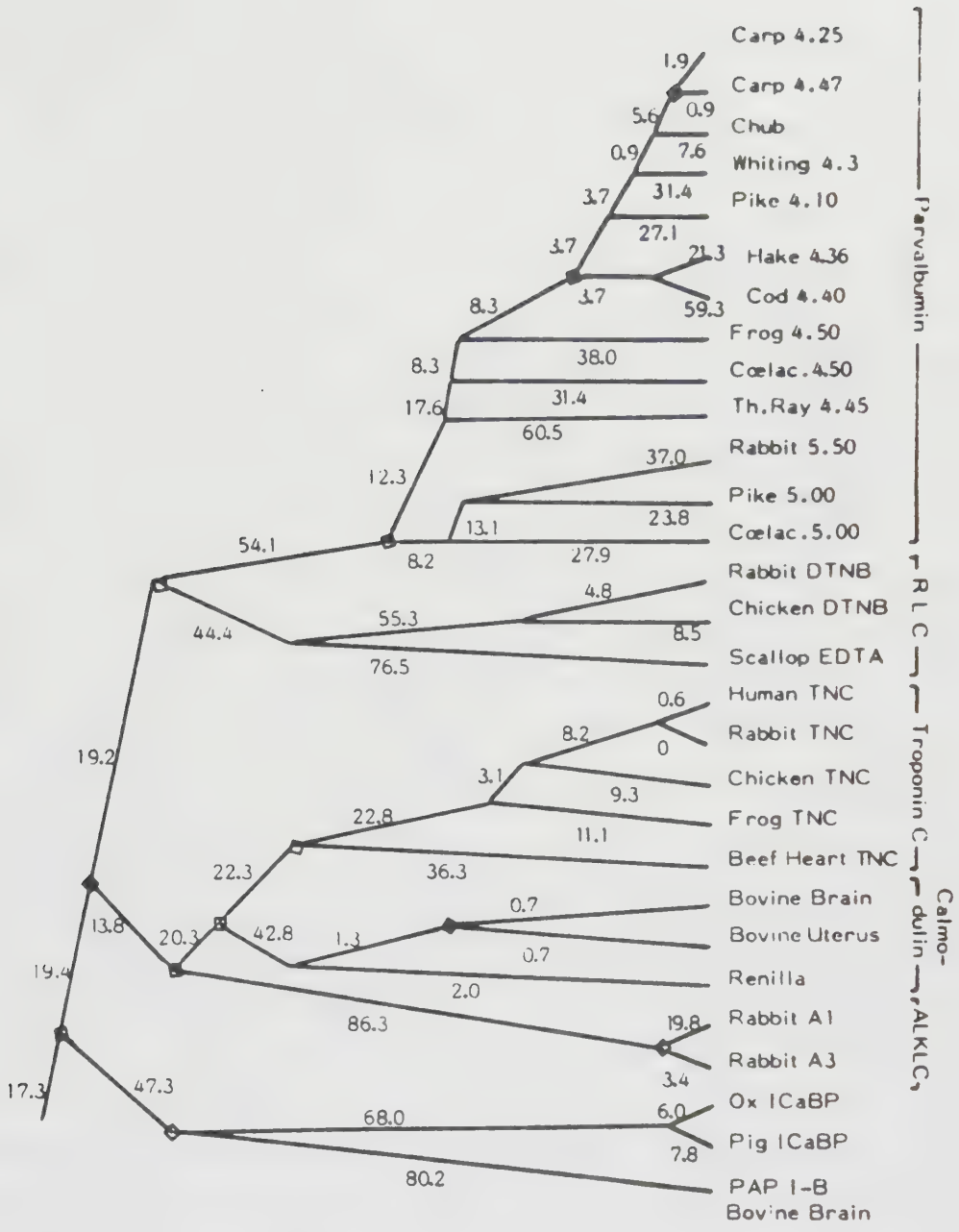


Figure 11 : Arbre évolutionnaire des calciprotéines intracellulaires de faible poids moléculaire. Les nombres représentent les remplacements nucléotidiques pour 100 codons. ◇ désigne une duplication évidente. ◆ est utilisé quand il y a seulement probabilité de duplication (d'après Demaille et al. 1980).

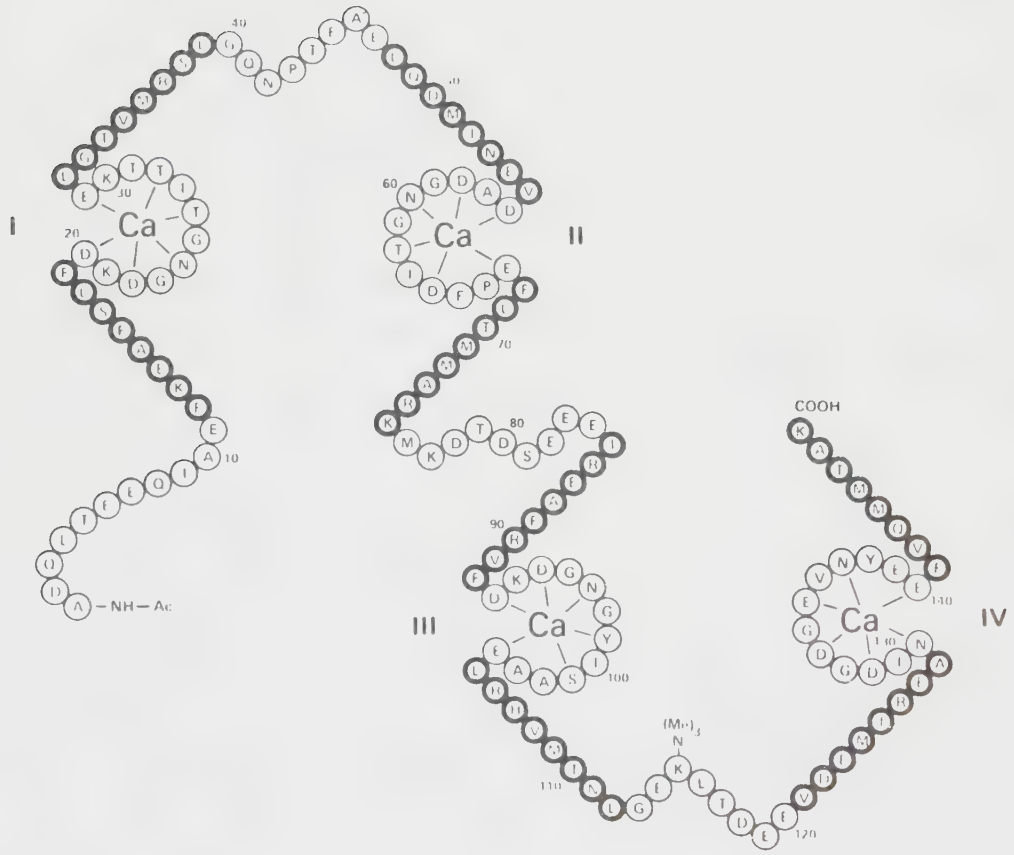


Figure 12 : Séquence de la calmoduline de cerveau de boeuf établie par Watterson et al. (1981). La représentation est destinée à mettre en évidence les analogies de structure entre les quatre domaines calciques (d'après Klee et al. 1980).

environ 10^4 fois plus élevée que celle du calcium. Dans le myocyte activé, la calmoduline lierait donc 3 Ca^{2+} et 1 K^+. Il a été observé dans le cas de la phosphodiestérase (Huang et al. 1981), de la myosine kinase (Blumenthal et Stull 1980), et du système microtubulaire (Means et Dedman 1980) que la calmoduline devait être saturée en Ca^{2+} pour être biochimiquement active. Si certaines enzymes exigent une Ca^{2+}_4-calmoduline pour leur activation, il est possible que d'autres puissent être activées par la calmoduline non saturée en Ca^{2+} (Haiech et al. 1981). L'activation séquentielle de différentes enzymes par la calmoduline à différents états de saturation peut d'ailleurs contribuer à une sélectivité d'activation (Haiech et al. 1981). La liaison en Ca^{2+} s'accompagne d'une modification importante de la structure tertiaire (Klee 1977) et découvre une région hydrophobe jouant un rôle dans la liaison avec la protéine-cible (La Porte et al. (1980). Ce même site peut être bloqué notamment par un certain nombre de dérivés de la phénothiazine en présence de Ca^{2+} (Weiss et al. (1980), avec inhibition de la fonction biologique de la calmoduline.

2.1.1.3. Fonction

Elle est de transmettre à plusieurs cibles intracellulaires l'information transportée par l'ion Ca^{2+}. Par analogie avec l'AMPc relayant l'information hormonale au niveau de récepteurs spécifiques intracellulaires, le calcium est souvent considéré comme le second messager de la dépolarisation membranaire (Cheung 1982). Le message calcique est également destiné à des récepteurs intracellulaires spécifiques qui sont les calciprotéines. Les calciprotéines sont nombreuses (revue dans Moore et Dedman 1982), mais la calmoduline est la seule activatrice potentielle de systèmes intracellulaires différents. La liste, certainement provisoire, des enzymes ou fonctions cellulaires dont l'activité dépende de la calmoduline est établie dans le tableau II. L'activation d'une enzyme, comme la myosine kinase par exemple, est réalisée par la séquence d'événements suivante :

4 Ca^{2+} + calmoduline ----> $(Ca^{2+})_4$-calmoduline + apoenzyme inactive ----> $((Ca^{2+})_4$-calmoduline-enzyme) = holoenzyme active

La liaison de la calmoduline activée - c'est-à-dire dont le site

TABLEAU II

ENZYMES ET FONCTIONS CONTROLEES PAR LA CALMODULINE

Système	Références
Métabolisme des nucléotides cycliques	
- Adénylate cyclase	- Brostrom et al.1975, Cheung et al. 1975
- Guanylate cyclase	- Nago et al. 1979
- Phosphodiestérase	- Cheung 1970, Kakiuchi et Yamazaki 1970
Contraction musculaire	
- Myosine kinase	- Barylko et al.1978, Dabrowska et al. 1978, Yagi et al.1978, Walsh et al. 1979
- Phosphorylase kinase	- Cohen et al. 1978, De Paoli-Roach et al. 1979
Cytosquelette	
- assemblage des microtubules	- Marcum et al. 1978, Nishida et al. 1979, Kakiuchi et Sobue 1981
- tubuline kinase	- Burke et De Lorenzo 1981
Flux calciques	
- Ca^{2+} Mg^{2+} ATPase	- Gopinath et Vincenzi 1977, Jarrett et Penniston 1977, Sobue et al.1979
- Transport du Ca^{2+}	- Hinds et al.1978, Katz et Remtulla 1978, Le Peuch et al. 1979
Divers	
- Prolifération cellulaire	- McManus et al.1981, Sasaki et Hidaka 1982, Wei et Hickie 1981
- Transformation oncogénique	- Chafouleas et al. 1981
- Endocytose	- Salisbury et al. 1981
- Neurotransmission	- De Lorenzo et al. 1979
- Phosphorylation	- Delcayre et al.1983, Katoh et al. 1981, Schulman et Greengard 1978
- NAD kinase	- Anderson et Cormier 1978
- Protéine I kinase	- Kennedy et Greengard 1981
- Trp-5-oxygénase kinase	- Yamauchi et Fujizawa 1981
- Pyruvate kinase kinase	- Nakashima et al. 1982
- Mitose	- Welsh et al. 1979
- Maturation méiotique	- Cartaud et al. 1980

d'interaction hydrophobe est découvert - à l'apoenzyme entraîne un changement de conformation de la myosine kinase et son activation (figure 13). La myosine kinase est d'ailleurs une des rares enzymes à être complètement inactive avant sa liaison avec la calmoduline; la plupart voient leur activité de base, non nulle, augmentée. Il est logique de supposer que les enzymes liant la calmoduline ont une partie de leur séquence - le site de liaison - identique ou similaire.

Comme le montre le tableau II, la calmoduline intervient dans plusieurs métabolismes, ce qui conduit à poser la question de la spécificité de son action au niveau cellulaire. Chaque cellule possède un équipement spécifique en protéines possédant une affinité pour la calmoduline; cette affinité peut être modifiée par phosphorylation, comme cela a été montré dans le cas de la myosine-kinase (Adelstein et al. 1978), ce qui favorise ou inhibe une voie métabolique. Des protéines ne possédant aucune activité enzymatique se lient à la calmoduline et peuvent jouer un rôle de régulation par compétition avec les enzymes calmoduline-dépendantes (Grand et Perry 1979, Kakiuchi et al. 1981, 1982, Klee et al. 1979, Malencik et al. 1982, Palfrey et al. 1982).

2.1.2. L'apoenzyme

Si la myosine kinase existe dans de nombreux tissus musculaires et non musculaires, on ne sait pas actuellement s'il existe un type unique d'enzyme ou des formes spécifiques à certains tissus. Cependant, les myosine kinases de sources variées ont des propriétés communes.

2.1.2.1. Propriétés communes à toutes les myosine kinases

a/ la myosine kinase possède une forte spécificité de substrat.

Elle ne phosphoryle significativement que la chaîne phosphorylable de la myosine (Adelstein et Klee 1981, Hathaway et Adelstein 1979, Nairn et Perry 1979, Pires et Perry 1977, Walsh et al. 1979). En désaccord avec Walsh et al. (1979), plusieurs auteurs ont montré que la myosine kinase phosphoryle toute chaîne légère phosphorylable avec une vitesse plus élevée si elle provient du même tissu (Adelstein et Klee 1981, Scordilis et Adelstein 1978, Wolf et Hofmann 1980). Cette spécificité peut s'expliquer par les différences de structure primaire des chaînes légères phosphorylables de muscle lisse, strié squelettique ou cardiaque,

ou constituer un argument pour postuler l' existence d'iso-myosine kinases. Les chaînes légères isolées de la myosine constituent le substrat le plus souvent utilisé pour le dosage in vitro de l'activité myosine kinase, alors qu'in vivo la chaîne légère est liée à la chaîne lourde. Lorsque ces deux substrats sont comparés in vitro, la myosine est phosphorylée un peu plus vite (Pires et Perry 1977) ou 6 fois plus vite (Daniel et Adelstein 1976) que les chaînes légères isolées. Au contraire, pour Mrwa et Hartshorne (1980), la chaîne légère est phosphorylée 24 fois plus vite si elle est isolée. Mais, surtout, l'utilisation de chaînes légères isolées supprime l'interaction entre les deux têtes de la myosine et son effet sur la cinétique de phosphorylation des deux chaînes légères (Persechini et Hartshorne 1981, 1983).

b/ la myosine kinase n'est active qu'après liaison à la calmoduline.

Cette propriété de liaison de la myosine kinase à la calmoduline en présence de Ca^{2+} est d'ailleurs exploitée pour purifier l'enzyme par chromatographie d'affinité. Parmi les calciprotéines, seule la calmoduline est capable d'activer la myosine kinase à des concentrations physiologiques (Adelstein et Klee 1981, Walsh et al. 1980b). Les inhibiteurs spécifiques de la calmoduline inhibent l'activité myosine kinase (Hidaka et al. 1979) mais pas l'activation contractile du muscle strié (Sheterline 1980).

Une molécule de calmoduline est liée par molécule de myosine kinase (Adelstein et Klee 1981, Blumenthal et Stull 1980, Crouch et al. 1981, Hartshorne et Mrwa 1980). La myosine kinase est inactive à pCalmoduline 9, et son activité est maximale à pCalmoduline 7; la demi-activation se situe à pCalmoduline 8 environ (Edelman et Krebs 1982, Walsh et al. 1980). Les concentrations calciques nécessaires à la liaison calmoduline-myosine kinase sont celles observées dans le muscle activé : à pCa^{2+} 6,2, 50 % de la myosine kinase lie la calmoduline (Crouch et al. 1981, Johnson et al. 1981). Johnson et al. (1981) observent deux phases successives, rapide puis lente, d'activation de l'enzyme par la calmoduline, avec des constantes de temps respectives de 65 et 6 s^{-1}. Ils remarquent que la liaison du Ca^{2+} à la calmoduline est très rapide, et ne peut pas constituer l'étape limitante. Seule exception, une myosine kinase

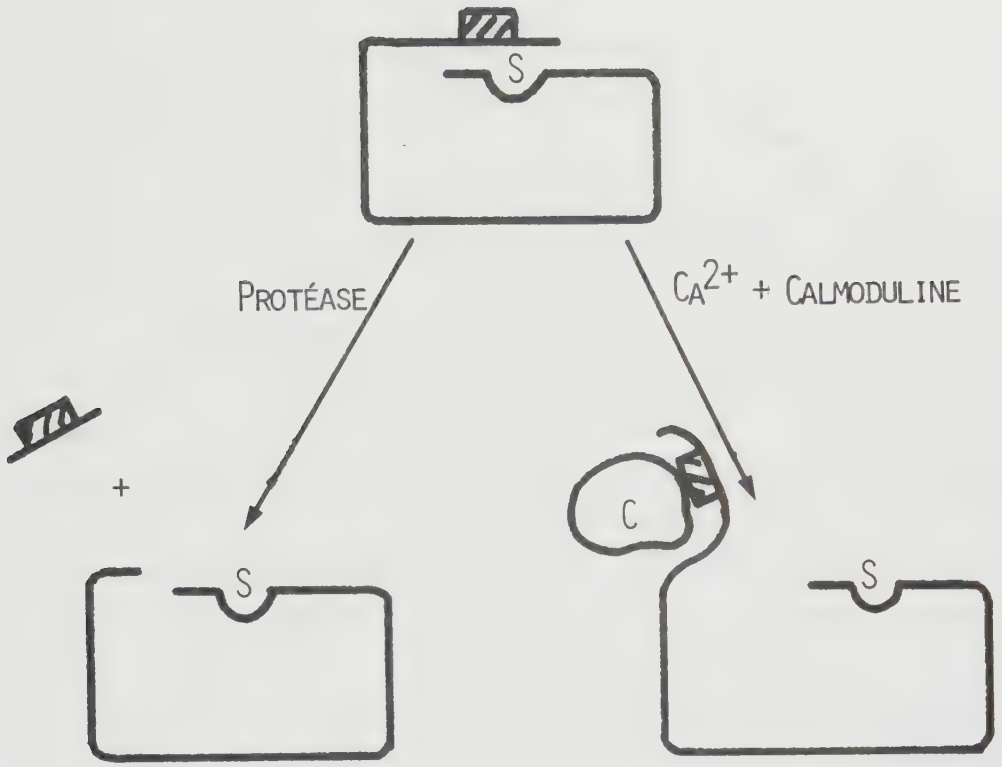


Figure 13 : Représentation schématique de l'activation probable de la myosine kinase par la calmoduline ou les protéases. Ce dessin est réalisé par analogie avec ce mécanisme démontré dans le cas de la phosphodiestérase (Klee 1980). S : site enzymatique, C : calmoduline. La partie hachurée représente le site de liaison à la calmoduline.

Ca^{2+}- et calmoduline-indépendante a été décrite dans les myoblastes d'une lignée cellulaire obtenue à partir de cultures primaires de muscle de rat (Scordilis et al. 1981).

La myosine kinase requiert également la présence de Mg^{2+}, mais son activité est inhibée par un excès de cet ion (Blumenthal et Stull 1980). L'activité enzymatique est maximale à pH 6,5-9 et est peu sensible à une augmentation de la force ionique; par contre, la liaison calmoduline-myosine kinase, fortement inhibée par une augmentation de force ionique, n'est maximale qu'entre pH 6 et 7,5.

c/ la myosine kinase est très sensible à la protéolyse.

Un des problèmes majeurs de l'étude des propriétés la myosine kinase est sa dégradation par les protéines tissulaires au cours de la purification. Cette observation est surtout vraie dans le cas du tissu cardiaque, riche en protéases. Une protéase associée aux membranes, insensible aux inhibiteurs classiques, a été mise en évidence dans le coeur de boeuf (Walsh et al. 1980a). La protéolyse affecte la myosine kinase par :

- la perte de la calmoduline-dépendance, i.e. l'activité enzymatique est équivalente en absence ou en présence de Ca^{2+} + calmoduline. Pour cette raison, le rôle de la calmoduline comme cofacteur de la myosine kinase n'a pas été reconnu tout de suite (Daniel et Adelstein 1976). Il a ensuite été observé que la myosine kinase calmoduline-dépendante devenait calmoduline-indépendante en présence d'actomyosine peu purifiée (Bremel et Shaw 1978), ou qu'une proportion variable de l'activité perdait sa calmoduline-dépendance au cours de la préparation (Adelstein et Klee 1981, Walsh et al. 1979, Walsh et al. 1980a, Wolf et Hofmann 1980). L'action de la trypsine (Foyt et al. 1982, Tanaka et al. 1980, Walsh et al. 1979) ou de la chymotrypsine (Walsh et al. 1982a) aboutit au même résultat. La figure 13 schématise l'action probable de la protéolyse ou de la calmoduline sur l'accessibilité du site actif.

- la diminution de l'activité enzymatique spécifique qui indique une dégradation plus poussée que l'étape précédente.

- l'apparition de fragments de faible Mr : la myosine kinase de muscle lisse d'un Mr 125.000 (Adelstein et Klee 1981) a d'abord été décrite comme une protéine de Mr 105.000 (Dabrowska et al. 1977), et Vallet et al.(1981) ont montré l'apparition d'un fragment minoritaire de

Mr 80.000 dans une préparation de myosine kinase d'aorte bovine de Mr 131.000-142.000; de même, la myosine kinase cardiaque de boeuf a vu son Mr augmenter de 85.000 (Walsh et al. 1979) à 94.000 (Wolf et Hofmann 1980). Walsh et Guilleux (1981) ont préparé une myosine kinase de Mr 155.000 à partir de la fraction myofibrillaire du muscle strié et proposent que les myosine kinases de plus faible Mr obtenues à partir de la fraction soluble du muscle strié sont des produits de protéolyse. En se basant sur la similitude des peptides tryptiques des myosine kinases de muscle lisse et cardiaque, ils formulent l'hypothèse que, dans tous les tissus, la myosine kinase est une protéine de Mr > 100.000 associée au système myofibrillaire (Walsh et al. 1980a, Walsh et Guilleux 1981).

2.1.2.2. Existe-t-il des myosine-kinases spécifiques du tissu ?

Le tableau III résume les principales propriétés de cette enzyme. S'il semble que, dans tous les tissus, une activité enzymatique spécifique de l'ordre de 10-30 µmol P. min^{-1}. mg^{-1} puisse être obtenue, le Mr de l'apoenzyme et l'effet de sa phosphorylation sur son affinité pour la calmoduline différencient les myosine kinases de muscle lisse et strié. Le Mr de la myosine kinase de muscle strié est-il de l'ordre de 90.000 ou de 130.000-155.000 ? Un anticorps anti-myosine kinase de muscle lisse ne marque qu'une protéine de Mr 130.000 dans le muscle lisse ou strié (Guerriero et al. 1981). Ce résultat est contredit par deux équipes qui n'identifient dans le muscle strié qu'une bande de Mr 75.000 (Cavadore et al. 1982) ou 90.000 (Nunnaly et Stull 1983) par la même technique immunologique. Cavadore et al (1982) suggèrent que la protéine de Mr 130.000 marquée dans le muscle strié par l'équipe de Means serait en réalité la myosine kinase lisse vasculaire artéfactuellement enrichie dans l'échantillon testé par l'extraction à faible force ionique. Des différences dans la composition en acides aminés des myosine kinases de muscle lisse et strié ont été observées par Crouch et al. (1981).

La kinase AMPc-dépendante phosphoryle la myosine kinase de muscle lisse en un site (en présence de Ca^{2+} + calmoduline) sans conséquence connue, et en deux sites (en absence de calmoduline) avec diminution de 10-20 fois de l'affinité de la myosine kinase pour la calmoduline (Conti et Adelstein 1981). Les myosine kinases de muscle strié squelettique (Edelman et Krebs 1982, Walsh et Guilleux 1981b) ou cardiaque (Wolf et

TABLEAU III

PROPRIETES DE LA MYOSINE KINASE DANS DIFFERENTS TISSUS MUSCULAIRES

Tissu	Mr	Vmax (1)	KdCaM (nM)	KmATP (uM)	Km L2 (uM)	Phosphorylation et effet (2)	Référence
MUSCLE STRIÉ							
Squelettique rapide	77.000-80.000	15-30		200-400	40-50		Pires et Perry 1977 Nairn et Perry 1979
	80.000	4,3		280	24		Yazawa et Yagi 1978
	90.000	5	0,86		20		Blumenthal et Stull 1980
	81.000	23	8 (3)				Crouch et al. 1981
	155.000	3	6,6			KAc =	Walsh et Guilleux 1981
	91.000	23	1-4			KAc =	Edelman et Krebs 1982
Coeur : boeuf	85.000	0,03	1,3	175	21		Walsh et al. 1979
	94.000	15-23	3-5	220	11-20	KAc,CC =	Wolf et Hofmann 1980
chien	65.000	0,5-2				CC =	Rappaport et Adelstein 1980
boeuf	155.000		2,2			KAc ↙	Walsh et Guilleux 1981
MUSCLE LISSE							
Gésier poulet	105.000	5-15		60-70		KAc	Dabrowska et al. 1977
dinde	124.000-130.000	10-30	1	50	5	KAc ↙	Adelstein et Klee 1981
Aorte boeuf	142.000-131.000	2-6	6,3			KAc ↙	Vallet et al. 1981

Estomac boeuf	155.000	8,9	1,3	KAc	↙	Walsh et al. 1982 B

(1) µmol P. min^{-1}.mg^{-1}

(2) KAc : par la kinase AMPc-dépendante; CC : en présence de Ca^{2+} + calmoduline;
= ou ↙ : effet sur l'affinité pour la calmoduline

(3) varierait de 1-70 nM selon les conditions de mesure

Hofmann 1980) ne montrent aucun changement d'activité après phosphorylation par la kinase AMPc-dépendante. Le même résultat est obtenu si la myosine kinase est autophosphorylée en présence de Ca^{2+} + calmoduline (Rappaport et Adelstein 1980, Wolf et Hofmann 1980). Par contre, la myosine kinase cardiaque de Mr 155.000 se comporte comme la myosine kinase de muscle lisse après phosphorylation par la kinase AMPc-dépendante (Walsh et Guilleux 1981).

2.2. Les phosphatases

L'enzyme qui déphosphoryle la chaîne légère L2 de la myosine est beaucoup moins bien connue que la kinase. A partir du muscle squelettique blanc de lapin, Morgan et al.(1976) ont purifié, par une technique dont la phase finale est une chromatographie d'affinité sur colonne de sépharose 4B-L2 phosphorylée, une myosine phosphatase de Mr 70.000 possédant une haute affinité pour la chaîne L2. Cette enzyme possède une activité indépendante de Mg^{2+} et n'est pas inhibée par NaF. Pato et Adelstein (1980) utilisent également la chromatographie d'affinité sur colonne de sepharose 4B-L2 thiophosphorylée pour purifier deux phosphatases dans le gésier de dinde : la phosphatase I est composée de 3 sous-unités de Mr 60.000, 55.000, et 38.000, et déphosphoryle non seulement la chaîne légère de myosine, mais aussi la myosine kinase à une vitesse inférieure de moitié; la phosphatase II est beaucoup plus spécifique de la chaîne légère, requiert Mg^{2+} et n'est formée que d'une chaîne de Mr 43.000. Une troisième phosphatase, non purifiée actuellement, est mise en évidence dans la fraction phosphatase I et, au contraire des deux précédentes, accepte la myosine comme substrat (Pato et Adelstein 1982). Une phosphatase spécifique de la myosine et de L2 isolée a été purifiée du muscle lisse aortique (Werth et al. 1982) et comprend 2 sous-unités de Mr 67.000 et 38.000. Elle est inhibée par le pyrophosphate et requiert Mn^{2+} ou Co^{2+}. Toutes ces enzymes ont une activité spécifique de 0,5-5 µmol P. min^{-1}. mg^{-1}. Le contrôle in vivo de l'activité de la myosine-phosphatase est inconnu.

2.3. La phosphorylation de la chaine légère : son rôle

Le déclenchement de la contraction fait suite, dans tous les muscles, à une augmentation de la concentration calcique intracellulaire.

Mais la séquence des événements biochimiques et les protéines impliquées dans l'activation du système contractile diffèrent suivant le type de muscle. La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine semble fondamentale dans le muscle lisse ou les cellules non musculaires, alors que son rôle dans le muscle strié reste à définir.

2.3.1. Le muscle lisse et les cellules non musculaires

La majorité des auteurs admettent que l'activation de l'ATPase de l'acto-myosine du muscle lisse et des cellules non musculaires est activée par la phosphorylation de la chaîne légère phosphorylable de la myosine. Une relation a été montrée entre le niveau de phosphorylation de la chaîne légère et 1/ la valeur de l'ATPase dans le gésier (Aksoy et al. 1976, Sobieszek et Small 1977, Walsh et al. 1982 c), le canal déférent (Chacko et al. 1977), l'utérus (Lebowitz et Cooke 1979), le muscle trachéal (De Lanerolle et Stull 1980), les plaquettes (Adelstein et Conti 1975), les macrophages (Trotter et Adelstein 1979), ou 2/ la tension Ca^{2+}-induite dans des fibres pelées de gésier (Hoar et al. 1979). Après phosphorylation par l'ATP-γ-S, la chaîne légère ne peut pas être déphosphorylée par la phosphatase. La tension développée par des fibres lisses pelées augmente avec la thiophosphorylation de la chaîne légère et reste élevée quand la concentration calcique est abaissée au niveau de repos (Cassidy et al. 1979, Cassidy et Kerrick 1982). Toutefois la relation entre ATPase et phosphorylation de la chaîne légère n'est pas linéaire et implique une coopérativité des deux têtes de la myosine (Persechini et Hartshorne 1981), et vraisemblablement d'autres protéines comme la tropomyosine (Chacko 1981) ou des contaminants qui restent à identifier (Persechini et al. 1981). Dans le muscle lisse artériel (Aksoy et al. 1982, Dillon et al. 1981, Dillon et Murphy 1982) ou la trachée (Silver et Stull 1982), le niveau de phosphorylation de la chaîne légère augmente parallèlement à la tension musculaire, mais diminue ensuite alors que la tension reste élevée. Ces auteurs supposent que la phosphorylation contrôlerait la vitesse du cycle des ponts actine-myosine et permettrait l'apparition de ponts bloqués permettant le développement d'une tension élevée pour une consommation d'ATP très faible.

En opposition avec ce modèle, plusieurs équipes n'observent pas de relation entre la phosphorylation de la chaîne légère et l'ATPase de

l'actomyosine de gésier (Cole et al. 1982, Mikawa et al. 1977) . Mikawa et al. (1978) décrivent un système de protéines régulatrices associées au filament fin du muscle lisse : la léiotonine C (Mr 18.000) liant le Ca^{2+} et la léiotonine A (Mr 80.000) dont le rôle serait comparable aux troponines du muscle strié.

2.3.2. Le muscle strié squelettique

Dans le muscle strié, l'activation de l'ATPase de la myosine dépend de l'intervention du complexe troponine. Les recherches ont donc porté sur un rôle de modulation de l'activité ATPase ou de l'interaction actine-myosine par la phosphorylation. Contrairement au muscle lisse, la phosphorylation de la chaîne légère ne modifie pas l'ATPase de la myosine ou de l'actomyosine dans le muscle squelettique (Morgan et al. 1976, Stull et al. 1980). Il n'y a pas non plus de modification de la tension active développée par des fibres pelées (Kerrick et al. 1981) ou reconstituées (Crooks et Cooke 1977). Par contre, Michnicka et al. (1982) et Pemrick (1980) observent une diminution du Km de l'actine pour la myosine, et Kakol et al. (1982) constatent une diminution de l'ATPase de l'actomyosine. Ces résultats ne sont pas obligatoirement en contradiction avec les précédents, car les préparations de myosine kinase ou de phosphatase utilisées ici sont peu purifiées et peuvent donc contenir des contaminants modifiant la réponse du système. La phosphorylation de L2 augmente rapidement de 0,5 à 0,9 mole P/mole L2 environ après contraction tétanique du muscle, ce qui est interprété comme une stimulation de la myosine kinase à la suite de l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Barany et Barany 1977, Barany et al. 1979, Stull et High 1977).

2.3.3. Le coeur

Le problème cardiaque peut être résumé par deux questions : 1/ y a-t-il des situations dans lesquelles le niveau de phosphorylation de L2 varie ? 2/ si oui, quelle est la signification de cette variation ?

Le tableau IV résume les résultats actuels. A la suite de l'observation de Frearson et al. (1976), démentie par la suite (Perry et al. 1978), plusieurs équipes ont cherché à relier inotropie et phosphorylation de L2. Il semble maintenant établi, sur le coeur de rat ou

TABLEAU IV

VARIATIONS DE PHOSPHORYLATION DE L2 DANS LE COEUR

Auteurs	Année	Préparation	Variation (en mol P/ mol L2)
Frearson et al.	76	lapin, coeur isolé perfusé adrénaline	↙ (2 à 1)
Holroyde et al.	79b	- id -	= (0,34)
Kopp et Barany	79	rat; coeur isolé perfusé Ca^{2+}, isoprotérénol	↗ (0,12 à 0,18) corrélée avec inotropie
High et Stull	79	lapin et rat; coeur isolé perfusé K^{+} et isoprotérénol	= (lapin : 0,48; rat : 0,61)
Jeacocke et England	80	rat; coeur isolé perfusé Ca^{2+} et adrénaline	= (0,66)
Barany et Barany	81	tortue : injection ^{32}P; 4°C	↗ de 30% pendant la systole
Carey et al.	81	chat; défaillance cardiaque	↙ de 57%
Litten et al.	81	lapin; intoxication thyroxine	= (0,41)
Meshkov et al.	81	chat; coeur isolé perfusé Ca^{2+}	↗ (1,2 à 1,8) corrélée avec inotropie
Resink et al.	81a	rat; 1/ course	↗ (0,08 à 0,096)
		2/ coeur isolé perfusé isoprotérénol	↗ (témoins : 0,08 à 0,26; traités : 0,096 à 0,38)
Resink et Gewers	81	rat; coeur isolé perfusé ouabaine	↗ (0,02 à 0,26)
Sistare et al.	81	rat; coeur isolé perfusé isoprotérénol	↗ de 264%
Westwood et Perry	81	lapin; coeur isolé perfusé adrénaline	= (0,50)

de lapin, qu'une variation à court terme (10-40 sec) de l'inotropie cardiaque, sous l'influence de l'adrénaline ou de ses analogues, de Ca^{2+} ou de K^{+}, ne soit pas associée à une variation de phosphorylation de L2 (Barany et Barany 1981, High et Stull 1980, Holroyde et al. 1979b, Jeacocke et Perry 1980, Westwood et Perry 1981). La variation obtenue par Frearson était sans doute due à une phosphoprotéine contaminant la préparation de chaînes légères utilisées pour la mesure (Perry et al. 1978). High et Stull (1980) ont en effet décrit une protéine de 18.400 (contre 19.800 pour L2) à laquelle 90% environ de la radioactivité de la fraction "chaînes légères" était liée. D'autre part, la relation linéaire établie par Kopp et Barany (1979) entre inotropie et phosphorylation de L2 décrivait vraisemblablement l'échange isotopique du ^{32}P entre les différents compartiments cellulaires et non la phosphorylation de L2 (High et Stull 1980). Les mêmes critiques sont applicables aux résultats de Meshkov et al. (1981) et Sistare et al. (1981). Une augmentation de phosphorylation de L2 a été observée chez le rat après perfusion cardiaque par l'ouabaïne (Resink et Gewers 1981).

Dans certaines expériences à long terme, une variation de phosphorylation de L2 a été décrite : augmentation chez des rats entraînés à courir (Resink et al. 1981a) et diminution chez le rat en insuffisance cardiaque (Carey et al. 1981). Les rats entraînés à courir montrent une hypersensibilité à l'isoprotérénol se traduisant par une augmentation de phosphorylation de L2 (Resink et al. 1981a).

Les expériences récentes, qui suggèrent un effet de la phosphorylation de la chaîne légère sur l'ATPase de la myosine du muscle strié squelettique ou cardiaque, seront abordées dans la discussion.

B. OBJECTIF DU TRAVAIL

1. Etude des variations transcriptionnelles de la myosine cardiaque

Deux faits se dégagent des observations décrites précédemment:

1/ la myosine cardiaque a dans tous les cas une activité Ca^{2+}-ATPase inférieure à celle du muscle squelettique blanc (Brahms et Kay 1963, Barany et al. 1964, Luchi et al. 1965, Swynghedauw et al. 1970, Muir et al. 1971, Swynghedauw 1974, Klotz et al. 1975) que la mesure soit effectuée sur la myosine, l'actomyosine, ou les myofibrilles.

2/ l'activité enzymatique du muscle squelettique varie dans des proportions considérables en fonction du type de muscle : les mesures de Barany montrent un rapport de 1 à 100 pour les valeurs extrêmes de l'actine-ATPase de myosine et 1 à 130 pour la Ca^{2+}-ATPase. Cependant, malgré la diversité d'espèces et de muscles étudiés par Barany (de la moule au chat et de l'utérus à l'extensor digitorum longus), la relation entre Vmax et l'ATPase de la myosine est très nette. Certains muscles, comme le soleus et l'extensor digitorum longus, ont été étudiés chez deux ou trois espèces animales. On remarque que l'ATPase de ces muscles est supérieure chez le plus petit animal. Est-ce là une loi générale ?

Il semblait donc intéressant d'étudier l'ATPase de la myosine d'un muscle donné en fonction de l'espèce. Le coeur fut choisi car il était considéré comme plus homogène que les différents types de muscles squelettiques. Henderson et al. (1970) avaient observé que la Vmax ventriculaire était différente chez quatre espèces animales domestiques. Les variations éventuelles de l'activité enzymatique de la myosine pourraient donc être comparées à ces mesures de contractilité. Il était important de savoir si les activités ATPase des myosines ventriculaires droite ou gauche et auriculaire présentaient des différences. Ces muscles travaillent en effet dans des conditions très différentes. D'autre part, les conditions extérieures et notamment l'exercice physique affectent les données du travail cardiaque. La mesure de l'ATPase de la myosine a donc été effectuée chez plusieurs espèces animales domestiques et une espèce sauvage.

Dans ces études, une variation significative de l'activité enzymatique pouvait être due à une variation de la structure primaire de

la myosine. Une hypothèse de travail du laboratoire proposait l'existence d'isoenzymes de la myosine. Dans le but de déceler une différence de structure entre les myosines d'espèces différentes, les sous unités légères ont été comparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Le même type d'étude a été appliqué à une situation dans laquelle la contractilité cardiaque est augmentée de manière importante et permanente. Il semblait plus facile de mettre en évidence l'apparition d'une myosine différente dans le cas de l'intoxication par la thyroxine qui induit progressivement une augmentation de contractilité cardiaque. Dans ce modèle, Yazaki et Raben (1975) ont observé une augmentation de l'ATPase de la myosine. Le but de ce travail était donc de corréler cette modification d'activité enzymatique avec l'incorporation d'un acide aminé marqué dans la myosine servant d'indicateur de la synthèse protéique.

2. Etude des variations post-transcriptionnelles de la myosine cardiaque

Les variations d'activité enzymatique de la myosine ont pu être reliées à des variations de la contractilité cardiaque (décrit dans la première partie des résultats). La surcharge mécanique cardiaque entraîne une hypertrophie du myocarde et une baisse de sa contractilité. Une autre équipe du laboratoire a montré que la diminution de l'activité enzymatique de la myosine connue depuis longtemps dans ce modèle (Alpert et Gordon 1962, Berson et Swynghedauw 1973, Swynghedauw et al. 1973, Swynghedauw et al. 1976) est reliée à l'apparition dans le coeur hypertrophié d'une forme différente de la myosine (Lompré et al. 1979). Ces phénomènes sont actuellement considérés comme le reflet d'une adaptation du myocarde à la surcharge, qui implique l'ensemble du métabolisme cellulaire (revue dans : Swynghedauw et Delcayre 1982). La surcharge mécanique a donc été choisie comme modèle expérimental pour tester l'hypothèse que la phosphorylation de la chaîne légère pouvait être reliée à l'activité ATPase de la myosine et participer à l'adaptation myocardique à la surcharge chronique. Contrairement au muscle lisse, la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine n'est pas essentielle dans le déclenchement de la contraction cardiaque. Par contre, le système phosphorylant, i.e. kinase et phosphatase, existe dans ce muscle sans fonction connue. Il a donc été proposé par plusieurs auteurs

(Barany et al. 1979, Bhan et al. 1981) que le niveau de phosphorylation de la chaîne légère pourrait moduler l'activité enzymatique de la myosine ou son interaction avec l'actine.

L'étude de ce système de phosphorylation a été entreprise par deux approches complémentaires.

La mesure du niveau de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine a été effectuée dans les coeurs de rat témoins et hypertrophiés par colorimétrie après séparation des formes phosphorylée et déphosphorylée par électrophorèse et isoélectrofocalisation.

Une partie importante du travail a consisté à mettre au point une méthode de purification partielle de la myosine kinase à partir du coeur de rat. Le but recherché n'était pas d'obtenir l'enzyme pure, la quantité de coeur de rat hypertrophié étant limitée, mais de purifier la myosine kinase de coeur normal et hypertrophié dans des conditions strictement identiques pour obtenir une activité mesurable et reproductible. Plusieurs auteurs (Frearson et al. 1976, Jeacocke et England 1980) ont conclu, sur la base d'une activité enzymatique faible, que la concentration de la myosine kinase était plus faible dans le coeur que dans les autres types de muscle. La visualisation de la myosine kinase et de la calmoduline par immunofluorescence dans des myocytes cardiaques isolés avait un double but : montrer que ces protéines existaient en association avec le réseau myofibrillaire -condition nécessaire pour qu'elles puissent jouer un rôle dans la contraction- et préciser leur localisation intracellulaire.

La phosphorylation de substrats endogènes dans des fractions cytosoliques du coeur de rat normal ou hypertrophié a également été étudiée. En effet, la calmoduline active plusieurs kinases dans le coeur, comme la myosine kinase et la phosphorylase kinase qui ont fait l'objet de nombreux travaux ou la phospholambane-kinase et la glycogène synthase-kinase dont les substrats sont identifiés (revue dans Cohen 1982). Mais également plusieurs équipes ont mis en évidence des activités kinases calmoduline-dépendantes s'exerçant sur des protéines non identifiées. L'importance potentielle des phénomènes activés par le Ca^{2+} et la calmoduline dans les systèmes contractiles étant évidente, il était intéressant de savoir si le coeur hypertrophié présentait des différences par rapport au normal, de ce point de vue.

C. RESULTATS

1. LES MODIFICATIONS TRANSCRIPTIONNELLES DE LA MYOSINE

Les trois articles décrits ci-dessous concernent les variations des propriétés de la myosine cardiaque. Les articles 1 et 2 s'intéressent aux variations observées chez l'animal normal en fonction de l'espèce, tandis que l'article 3 semble rompre avec les travaux précédents en décrivant une étude réalisée dans des conditions extra-physiologiques. En fait, ces travaux s'inscrivent dans un même cadre, celui de l'étude de l'adaptation de la myosine aux conditions du travail cardiaque. En effet, il semble établi actuellement que les mécanismes d'adaptation utilisés par le coeur dans des conditions physiologiques (développement, exercice physique) ne diffèrent pas dans leur essence de ceux observés en pathologie (revue dans l'article 6).

1.1. Etude comparative de l'ATPase et des chaînes légères de la myosine cardiaque de différentes espèces

(Article 1 : Delcayre C, Swynghedauw B (1975) Pflugers Arch 355, 39-47).

La myosine a été purifiée, à partir du coeur de plusieurs espèces et du muscle squelettique rapide de lapin ou lent de cobaye, par une méthode dérivée de celle de Perry (1955). Les myosines cardiaques de rat et chien ont été ensuite soumises à une chromatographie sur QAE-sephadex (Swynghedauw et al. 1973). L'activité enzymatique a été mesurée en présence de Ca^{2+} 10 mM.

L'ATPase de la myosine cardiaque varie en fonction de l'espèce (article 1, Tableau 1). Elle est d'autant plus élevée que l'animal est plus petit. Les valeurs mesurées chez le rat, le cobaye, le lapin et le chien sont corrélées avec les valeurs de la vitesse maximale de raccourcissement à charge nulle publiées par Henderson et al. (1970) (article 1, figure 4).

Les chaînes légères des myosines cardiaques ne présentent pas de différence sur électrophorèse en présence de sodium dodécylsulfate, mais l'électrophorèse en présence d'urée 8 M révèle que la myosine de coeur de rat ne contient pas la forme phosphorylée de la chaîne légère de Mr

18.000 (article 1, figures 1 à 3).

1.2. Etude comparative de l'ATPase et des chaînes légères de la myosine ventriculaire droite et gauche et auriculaire de différentes espèces

(Article 2 : Sirovy I, Delcayre C, Swynghedauw B (1979) J Mol Cell Cardiol 11, 1129-1135).

La myosine est purifiée à partir des ventricules et des oreillettes droits et gauches de sept espèces animales dont une sauvage.

Les activités Ca^{2+}- et K^{+}-ATPase et l'aspect électrophorétique des chaînes légères de la myosine sont identiques dans les ventricules droits et gauches de toutes les espèces. Aucune différence d'activité (article 2, tableau 1) ou d'aspect électrophorétique (article 2, planche 1) n'est observée entre les myosines auriculaires droites et gauches de quatre espèces animales. Par contre, les activités Ca^{2+}- et K^{+}-ATPase des myosines auriculaires sont supérieures à celles des myosines ventriculaires chez ces quatre espèces. Les chaînes légères des myosines auriculaires ont un poids moléculaire différent de celui des myosines ventriculaires (article 2, planche 1).

L'activité Ca^{2+}-ATPase des myosines ventriculaires et auriculaires est d'autant plus élevée que l'espèce est plus petite, sauf dans le cas du lièvre dont la myosine a une activité enzymatique supérieure à celle du rat. Ceci suggère que l'activité physique peut modifier l'activité ATPase de la myosine cardiaque.

1.3. Etude comparative des modifications de la synthèse et de l'ATPase de la myosine au cours de l'intoxication par la thyroxine chez le lapin

(article 3 : Delcayre C, Swynghedauw B (1979) Pathol Biol 27, 36-40).

L'injection quotidienne d'une dose supra-physiologique de thyroxine entraîne chez le lapin une augmentation de 100 % de l'activité ATPase de la myosine cardiaque (Yazaki et Raben 1975).

L'incorporation de ^{3}H-lysine dans la myosine cardiaque est corrélée avec l'activité enzymatique (article 3, figures 1 et 2) et avec l'hypertrophie (article 3, figure 1), ce qui est un argument en faveur de la synthèse d'une nouvelle myosine dans le coeur hypertrophié.

L'étude par électrophorèse en présence de sodium dodécylsulfate ne

montre aucune différence de structure entre les myosines des animaux témoins et intoxiqués (article 3, figure 4).

Le traitement par le propranolol des lapins intoxiqués n'empêche pas l'augmentation de l'ATPase de la myosine. Ceci suggère que la modification des propriétés de la myosine par la thyroxine est plutôt due à une action directe de l'hormone qu'à la conséquence de l'augmentation du travail cardiaque.

1.4. Article 1

A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species.

1.5. Article 2

Comparison of ATPase activity and light subunits in myosins from left and right ventricles and atria in seven mammaliam species.

1.6. Article 3

Myosin synthesis and enzymatic properties during thyroxine intoxication in rabbits.

ARTICLE 1

Pflügers Arch. 355, 39–47 (1975)
© by Springer-Verlag 1975

A Comparative Study of Heart Myosin

ATPase and Light Subunits from Different Species *

Claude Delcayre and Bernard Swynghedauw

Groupe de recherche sur le métabolisme du cœur et des vaisseaux de l'I.N.S.E.R.M. (U 127), U.E.R. Biomédicale des Saints Pères, Paris, France

Received September 24, 1974

Summary. Heart myosin ATPase (measured with 10 mM $CaCl_2$, and 0.60 M KCl) was found to be higher in rats (423 nmoles of Pi/min/mg) than in guinea-pig (268 nmoles of Pi/min/mg), dogs (139 nmoles of Pi/min/mg) or rabbits (94 nmoles of Pi/min/mg). Rat heart myosin ATPase was found to be higher than that from a pure red skeletal muscle myosin (soleus from guinea-pig: 286 nmoles/min/mg) and only one third lower than that from fast skeletal muscle myosin from rabbits.

The heart myosin ATPase from rat, guinea-pig, and rabbit correlates with the maximum velocity of shortening at zero load of the myocardial muscle, as determined by other authors.

These four cardiac muscle myosins have the same two light subunits (M.W.: 27000 and 18000) in SDS polyacrylamide gel electrophoresis; one of them (M.W.: 18000) exists in guinea-pig and dog as two different molecules having a different charge, as shown in urea electrophoresis, but in the rat, this subunit is also unique in urea gel electrophoresis. Rat heart, apparently, does not possess the phosphorylated light subunit (M.W.: 18,000) described by others in rabbit heart myosin.

Attempts have been made to obtain a highly purified myosin, but this procedure does not suppress the striking difference which exists between rat and dog heart myosin ATPase.

Key words: Heart Myosin — Muscular Contraction — Myosin ATPase — Polyacrylamide Gel Electrophoresis — Myosin Light Subunits.

Since the pioneer work of Barany [1], several authors have correlated the theoretical maximum velocity of shortening of an unloaded muscle (V_{max}) with its myosin adenosine triphosphatase (ATPase: ATP-phosphohydrolase E.C. 3.6.1.3.) activity. Such a relationship was found to exist when comparing different skeletal muscles [1] or after a cross innervation experiment [2], but none of these studies concerned an homogenous muscle such as the myocardium.

Compared to the skeletal muscle, even to the so-called pure white or pure red muscle, the heart is very homogenous, and contains one type

* This work was supported by Grant ATP 21 n° 518 from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and by Grant n° 7270684 from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

of muscle cell. Nevertheless, it has been shown by Henderson [5] that one of the main physiological parameters defining heart muscle, i.e. V_{max}, differs from one species to another. For instance, V_{max} for rat heart was about twice that of guinea-pig.

Therefore, the main aim of this work was a comparative study of the myosin ATPase in the same organ, the heart, from different mammalians: rat, guinea-pig, rabbit and dog, in order to correlate our results with those obtained for V_{max} by Henderson. Myosin light subunits have been suggested to be involved in the control of the specific activity of the enzyme by several authors [4,15,20]. Fast skeletal muscle myosin possesses three light subunits (M.W.: 26000, 17000 and 15000) compared to the slow muscle which has only two (M.W.: 27000 and 18000). Therefore, the second aim of this work was to observe any differences in the light subunits of myosin from different hearts by mean of a detailed electrophoretic study.

Methods

Materials. Mongrel dogs (body weight: 25 kg), rabbits "Fauves de Bourgogne" (b.w.: 3.5 kg), Wistar rats (b.w.: 350 g) and guinea-pigs (b.w. 360 g) from laboratory breeding were used.

Preparation of Myosin. All manipulations for myosin isolation and purification were carried out at +4°C. Deionized water (resistivity above 20 MΩ) was usually slightly buffered with 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, and 5 mM 2-mercaptoethanol was added.

Dogs hearts were frozen in liquid nitrogen, stored at −20°C, and thawed prior to use; (such a storage does not modify the myosin ATPase specific activity [21]). The rabbits, rats and guinea-pigs were killed by mean of an intraperitoneal injection of Pentothal or by a blow on the head. The hearts were excised still beating and washed by a coronary perfusion of cold 25 mM KCl−39 mM sodium tetraborate−5 mM EDTA, pH 7.0, in order to increase the yield of myosin extraction (which is also strongly dependent of the speed of the first step).

The extraction was performed for 10 min in ten volumes of a Guba-Straub solution (0.30 M KCl−50 mM K_2HPO_4−100 mM KH_2PO_4−1 mM $MgCl_2$− 10 mM Na pyrophosphate, pH 6.9) in which 5 mM 2-mercapto-ethanol was added. The following stages of purification were then carried out, using the method of Perry [12].

In a few experiments, myosin was then recentrifuged in 0.30 M KCl, and chromatographed on a pyrophosphate (40 mM pH 7.6) QAE Sephadex A-50 column [19]. The pure myosin was stored at −20°C (after addition of one volume of glycerol, 5 mM 2-mercapto-ethanol and 10 mM Tris-HCl, pH 7.6), and used within the month.

Myosin Purity Control. It is well known that actin-contamined myosin has a high Mg^{2+}-activated ATPase, and this property is a reliable mean of assessing the purity of the preparation. Using the conditions described in the next section, we never obtained values superior to 40 nmoles of Pi/min/mg for our preparations of myosin (whatever the species or the type of muscle), and with the highly purified samples, the myosin Mg^{2+}-ATPase was zero.

The pattern obtained on polyacrylamide gel electrophoresis is also used as a criterion: the disappearance of the actin and tropomyosin bands (main conta-

ARTICLE 1

minants of myosin preparations) correlates with the decrease of the Mg^{2+}-ATPase activity. Our different preparations were not completely actin and tropomyosin free, but because of the high ionic strength medium used for Ca^{2+}-ATPase determination, we did not find any appreciable difference in the specific activity after further precipitations. The contaminant high molecular weight proteins (C-protein and others) shown on a SDS gel electrophoresis decreased after the purification on QAE Sephadex.

Measurement of ATPase Activity. Proteins were measured either with the Folin-Ciocalteu technique, or with the biuret-triton technique with appropriate standards and blanks [7]. Inorganic phosphate was measured in the presence of adenosine triphosphate as previously published [18]. Conditions of assays for ATPase: 20 mM Tris-HCl pH 7.6; 0.5 mM Tris-ATP pH 7.6; 0.05 to 0.10 mg of protein; 5 min; 27°C; final volume: 2 ml.

The reaction was initiated by myosin in order to minimize pH-dependent myosin degradation. The linearity of the reaction was checked routinely for each new preparation. For the Ca^{2+}-ATPase of myosin, 10 mM $CaCl_2$ and 0.6 M KCl were added. The Mg^{2+}-ATPase was measured in presence of 1 mM $MgCl_2$ in a low ionic strength (0.06 M KCl) medium.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Sodium dodecyl sulfate (SDS) gel electrophoresis on slabs was performed in a 12% acrylamide—0.3% NN′-methylenebisacrylamide gel, with 0.1% of SDS, and a 85 mM Tris—0.4 M sodium borate buffer (pH 7.1) [3], using a stacking gel (4% acrylamide, with a 54 mM Tris-27 mM H_2SO_4 buffer pH 7.1). Urea gel electrophoresis was carried out at pH 8.3 according to Perrie [10].

Results

Myosin ATPase (Table 1)

Heart myosin Ca^{2+}-ATPase specific activity was found to be twice as high in rats when compared to guinea-pig. Further, guinea-pig heart possessed an ATPase higher than dog heart.

We found the myosin Ca^{2+}-ATPase from rabbit white skeletal muscle > rat heart > red skeletal muscle from guinea-pig soleii > guinea-pig heart > dog heart > rabbit heart.

Table 1. Myosin Ca^{2+}-ATPase from different muscles (in nmoles of Pi/min/mg). Conditions of assays: 20 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.5 mM Tris-ATP; 0,10 mg/ml of myosin; 0.6 M KCl; 10 mM $CaCl_2$

Heart				Skeletal muscle	
Rat	Guinea-pig	Dog	Rabbit	Red[a]	White[b]
423 ± 11	268	139 ± 18	94	286	660
$N = 3$	$N = 1$	$N = 2$	$N = 1$	$N = 1$	
$n = 90$[c]	$n = 40$	$n = 6$	$n = 2$	$n = 80$	

[a] Soleus from guinea-pig.
[b] Back and legs from rabbit.
[c] N = number of pools; n = number of hearts or muscles.

ARTICLE 1

Other heart myosin ATPases from species whose heart ventricular muscle performances have not been studied were also determined and we found 253 nmoles of Pi/min/mg for sheep heart.

Samples from rat and dog heart myosin were extensively purified by several washes in 0.3 M KCl, and by a chromatography on a QAE-Sephadex A-50 pyrophosphate column. With such a procedure, actin, tropomyosin and C-protein impurities disappear and the 280 nm/260 nm ratios which were found to be 1.24 and 0.96 for rat and dog heart respectively, before chromatography, are 1.40 and 1.64 after chromatography. Similar results were observed for myosin ATPase of rat heart (423 nmoles of Pi/min/mg before chromatography and 407 afterwards) and for dog heart (154 and 141 nmoles of Pi/min/mg). The slight decrease of specific activity is due to the disappearance of contaminants having mainly an activating effect.

Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Myosin subunits were routinely studied using SDS or urea electrophoresis. Using SDS as a dissociating reagent, proteins migrate only according to their molecular weight, whereas using urea at alcaline pH, the separation is dependent on both molecular weight and charge.

Two light subunits (M.W.: 18000 and 27000) were shown on SDS electrophoresis with dog cardiac myosin (Fig. 1). Three bands appear on urea gel electrophoresis (Figs. 2 and 3), and the two fastest correspond to the phosphorylated and the non-phosphorylated form of the 18000 or 17000 daltons component shown by Perrie [11] in rabbit heart and white skeletal muscle myosins. The myosin light chains can be modified by proteolytic degradation which increases the amount of the very small subunits (M.W.: 12 to 13000). The rabbit, pig, sheep and guinea-pig cardiac myosin show the same pattern as for dog on SDS urea gel electrophoresis (Figs. 1 and 2).

The rat heart myosin has shown two light subunits in a SDS gel (Fig. 1), but also two subunits in an urea gel, using chromatographed myosin (Fig. 2a), crude myosin (Fig. 3a) as well as whole myofibrils (Fig. 3c). The third light chain which could correspond to the rabbit white skeletal muscle myosin phosphorylated light chain did not appear even when myosin was extracted with 3 or 20 volumes of the Guba-Straub pyrophosphate buffer (Figs. 3a and b).

Discussion

In summary, our main findings indicate: 1. Myosin Ca^{2+}-ATPase activity of the same organ, the heart, shows some important species variations. 2. These changes cannot be attributed to the molecular mass and to the number of the light chains, at least in dog, pig, sheep, rabbit

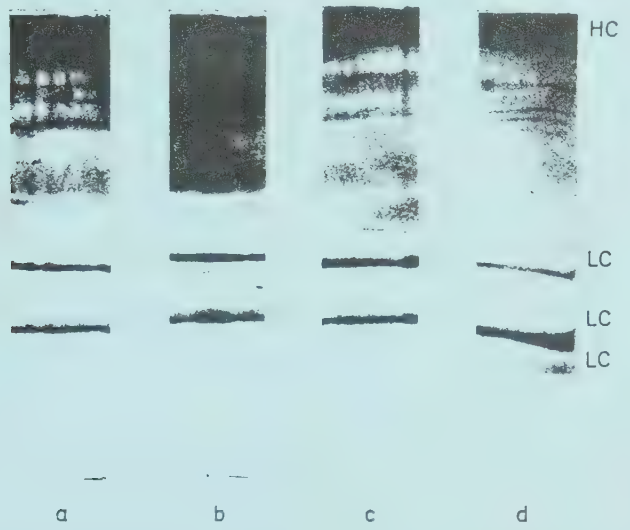


Fig. 1a—d. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. (a) Rat heart myosin (300 μg); (b) dog heart myosin (300 μg); (c) rabbit heart myosin (300 μg); (d) rabbit white skeletal muscle myosin (300 μg). Buffer: 85 mM Tris-0.4 mM boric acid, pH 7.1. *HC* Myosin heavy chains, *LC* light chains

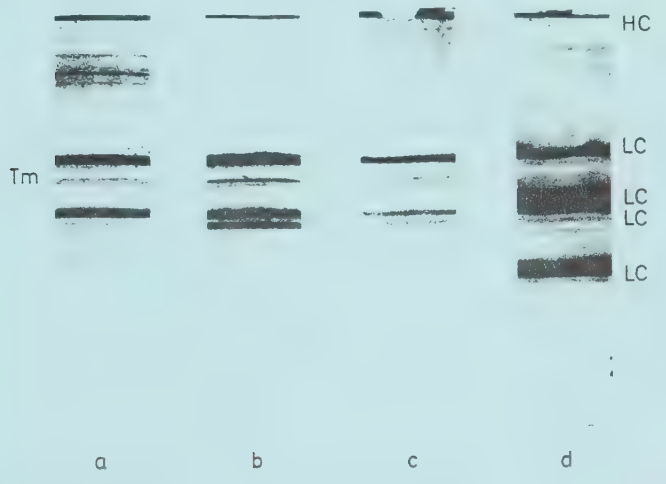


Fig. 2a—d. 8 M urea polyacrylamide gel electrophoresis. (a) Chromatographied rat heart myosin (300 μg); (b) dog heart Myosin (300 μg); (c) rabbit heart myosin (220 μg); (d) rabbit white skeletal muscle myosin (300 μg). Buffer: 20 mM Tris-125 mM glycine, pH 8.3, 8 M urea. *HC* myosin heavy chains; *LC* myosin light chains; *Tm* tropomyosin

ARTICLE 1

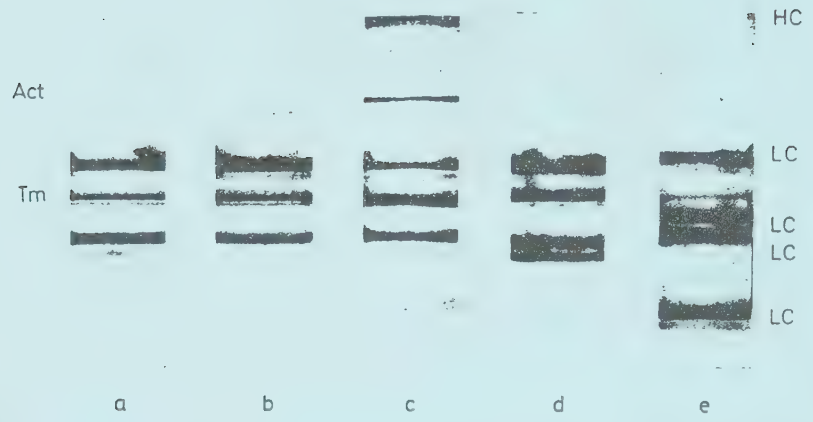


Fig. 3a—e. 8 M urea polyacrylamide gel electrophoresis. Conditions as for Fig. 2. (a) rat heart myosin (300 μg) extracted in 3 vol. of the Guba-Straub solution (see methods); (b) rat heart myosin (300 μg) extracted in 20 vol. of the same buffer; (c) rat heart myofibrils (400 μg); (d) dog heart myosin (300 μg); (e) rabbit white skeletal muscle myosin (300 μg). *HC* Myosin heavy chains; *LC* myosin light chains; *Tm* tropomyosin. *Act* actin

and guinea-pig. 3. The rat heart myosin subunit of M.W.: 18000 does not exist as two different forms with a different charge as for other muscles. The phosphorylated light subunit apparently does not exist in this muscle.

The heart myosin ATPase activity appears as a biochemical characteristic of a species, and correlates with the physiological performance of the muscle as shown in the Fig. 4 where our results were plotted against V_{max} as determined on heart muscle by Henderson [5]. This observation is in good agreement with the results of Barany [1], and outlines the fact that myosin itself is a critical parameter in the determination of the contractile state.

Several molecular parameters have been implicated in the control of myosin ATPase: a) The innervation of the whole muscle seems to play a predominant role in the long-term control of the properties of the myosin molecule, as described in skeletal red and white muscle by Syrovy [17]. b) The presence of an inhibitor of the ATPase activity can be suspected in impure preparations, but similar results were obtained with highly purified myosin. Moreover, most of the myosin contaminants do not react with myosin in a high ionic strength medium. c) The most likely hypothesis is that several types of myosin [13], possessing small differences in the molecular structure of their actives sites, exist even in an homogenous muscle such as the heart.

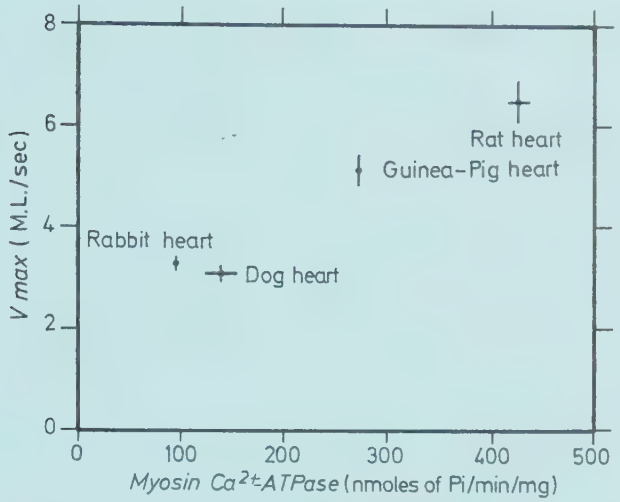


Fig. 4. Correlation between V_{max} (theoretical maximum velocity of fibre shortening at zero load), expressed in muscle lengths/second (data of Henderson) reference, [5], and heart myosin Ca^{2+}-ATPase activity of various species

Myosin different populations from white or red skeletal muscle were initially defined by their ATPase activity and their light subunits. Red muscle or heart has two subunits (M.W.: 18000—26000) which are sharply different from those of white muscle (M.W.: 15000—17000—25000) [10,14]. Moreover these two muscle myosins differ for their sensitivity to tryptic hydrolysis, content in methylated histidine, percentage of helicity and primary structure of some of their peptides [6,8,9]. The increase in myosin ATPase specific activity we found in rat heart compared to other species does not correlate with the myosin light subunits molecular weight since this parameter is identical in all the heart myosins. Nevertheless, rat heart myosin light subunits differ in their charge from those of the species as is shown in urea gel electrophoresis. One of the subunit corresponding to the phosphorylated light subunit described in rabbit heart and white skeletal muscle myosin [11] was not shown even in myofibrils or even after extraction in a large volume of the Guba-Straub pyrophosphate buffer [11]. The absence of the phosphorylated form of the 18000 light subunit in rat heart may be due to a lack of the sarcoplasmic phosphorylating enzyme or to a small difference in the structure of the peptide. This point was not explored. This result could suggest that the presence of a phosphorylated myosin light subunit has a physiological significance. The presence of such a light chain e.g. in heart myosin from guinea-pig whose myosin

ARTICLE 1

ATPase was located between dog and rat, does not exclude this hypothesis. Indeed the phosphorylation of the light chains occurs during the extraction procedure [11] and can be achieved during this time provided the enzyme is present even if in a low amount.

Note. Since this work has been finished, similar results were presented by Syrovy [15] at the meeting of the European section of the International study Group for Study on Heart Metabolism, in Prague in June 1974, but in this work there is no mention about the lack of a light subunit in urea electrophoresis in rat heart myosin.

Acknowledgements. We have to thank J. Bercovici for technical assistance, J. J. Leger and M. Stephens for rereading this paper, and Dr. Henderson for kind advices.

References

1. Barany, M.: ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. J. Gen. Physiol. **50**, 197—216 (1967)
2. Buller, A. J., Mommaerts, W. F. H. M., Seraydarian, K.: Enzymatic properties of myosin in fast and slow twich muscles of the cat following cross-innervation. J. Physiol. (Lond.) **205**, 581—597 (1969)
3. Cummins, P., Perry, S. V.: The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. Biochem. J. **133**, 765—777 (1973)
4. Dreizen, P., Richards, D. H.: Studies on the role of light and heavy chains in myosin ATPase. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **37**, 29—45 (1973)
5. Henderson, A. H., Craig, R. J., Sonnenblick, E. H., Urschel, C. W.: Species differences in intrinsic myocardial contractility. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) **134**, 930—932 (1970)
6. Huszar, G., Elzinga, M.: Homologous methylated and non-methylated histidine peptides in skeletal and cardiac myosins. J. biol. Chem. **247**, 745—753 (1972)
7. Layne, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. I: Methods in enzymology. Vol. III, pp. 447—454. New York: Academic Press 1957
8. Mac Carl, R. L., Margossian, S. S.: Characterisation of rat heart myosin. I: Isolation and physical properties. Biochemistry 8, 3655—3658 (1969)
9. Mueller, H., Theiner, M., Olson, R. E.: Macromolecular fragments of canine cardiac myosin obtained by tryptic digestion. J. biol. Chem. **239**, 2153—2159 (1964)
10. Perrie, W. T., Perry, S. V.: An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. Biochem. J. **119**, 31—38 (1970)
11. Perrie, W. T., Smillie, L. B., Perry, S. V.: A phosphorylated light chain component of myosin from skeletal muscle. Biochem. J. **135**, 151—164 (1973)
12. Perry, S. V.: Myosin adenosine triphosphatase. In: Methods in enzymology, Vol. II, p. 582. New York: Academic Press 1955
13. Sarkar, S.: Stoïchiometry and sequential removal of light chains of myosin. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **37**, 14—17 (1973)
14. Sarkar, S., Sreter, F. A., Gergely, J.: Light chains of myosin from white, red and cardiac muscle. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **68**, 946—950 (1971)
15. Stracher, A.: Evidence for the involvement of light chains in the biological functioning of myosin. Biochem. biophys. Res. Commun. **35**, 519—525 (1969)

ARTICLE 1

16. Syrovy, I.: (Abstract) Properties of cardiac and skeletal myosin from mammals differing in size. International Symposium on Adaptability of Cardiac Muscle. Prague, June 12—14 (1974)
17. Syrovy, I., Gutman, E., Melichna, J.: Differential responses of myosin. ATPase activity and contraction properties of fast and slow rabbit muscles following denervation. Experientia (Basel) **27**, 1426—1427 (1971)
18. Swynghedauw, B., Bouveret, B., Piguet, V.: Le dosage du phosphore inorganique en présence d'adenosine-triphosphate. Ann. Biol. Clin. **28**, 159—163 (1970)
19. Swynghedauw, B., Klotz, C., Leger, J. J., Preteseille, M.: Heart myosin adenosine triphosphatase and light subunits in experimental chronic aortic insufficiency in the rabbit. J. Mol. Cell. Cardiol. **5**, 501—514 (1973)
20. Weeds, A. G., Frank, G.: Structural studies on the light chains of myosin. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **37**, 9—14 (1973)
21. Wikman-Coffelt, J., Zelis, R., Fenner, C., Mason, D. T.: Myosin chains of myocardial tissue. In: Purification and immunological properties of myosin heavy chains. Biochem. biophys. Res. Commun. **51**, 1097—1104 (1973)

Dr. B. Swynghedauw
Groupe de recherche sur le métabolisme
du cœur et des vaisseaux de l'INSERM
UER Biomédicale des Saints Pères
45, rue des Saints Pères
F-75270 Paris Cedex 6/France

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (1979) **11**, 1129–1135

Comparison of ATPase Activity and Light Subunits in Myosins from Left and Right Ventricles and Atria in Seven Mammalian Species

IRO SYROVY, CLAUDE DELCAYRE AND BERNARD SWYNGHEDAUW*

*Institute of Physiology, Czechoslovak Academy of Sciences, 14220 Prague 4, Budejovicka 1083 and INSERM U 127, Hôpital Lariboisière, 41 Bd de la Chapelle, Paris 10e, France**

I. SYROVY, C. DELCAYRE AND B. SWYNGHEDAUW. Comparison of ATPase Activity and Light Subunits in Myosins from Left and Right Ventricles and Atria in Seven Mammalian Species. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (1979) **11**, 1129–1135. Comparison of myosins from left and right ventricles and atria of rat, cat, hare, rabbit, dog, pig and cow resulted in four observations: (i) the Ca^{2+}- and K^{+}-ATPase activities and electrophoretic patterns of both light subunits were identical in left and right ventricle myosins, whatever the species (respective mol. wts of subunits: 26 000 and 18 000). (ii) There were no inter-species differences between left and right atrial myosins from hare, dog, cow and pig, but Ca^{2+}- and K^{+}-ATPase activity was usually higher in atrial than ventricular myosin, in the same species. In addition, the mol. wts of the two light atrial myosin subunits (24 000 and 20 000 respectively) differed from the mol. wts of the ventricular subunits. As with fast skeletal myosin, dithio-bis-nitrobenzoic acid eliminated one of the light subunits (mol. wt 20 000) from atrial but not from ventricular myosin. (iii) The Ca^{2+}-ATPase activity of ventricular and atrial myosins was higher in the hearts of small animals like the rat than in the hearts of larger animals. There were no differences between species with regard to the mol. wts of light subunits. (iv) Ca^{2+}-ATPase in ventricular myosin was more active in the hare than the domestic rabbit, even though the rabbit's heart is half the size of the hare's, which suggests that myosin ATPase activity is essentially adapted to the requirements of the animal's predominant physical activity.

KEY WORDS: Myosin ATPase; Light myosin subunits; Ventricles; Atria; Polyacrylamide gel; Ca^{2+}-ATPase.

1. Introduction

It is now well established that contraction speed and Ca^{2+}-ATPase activity differ in mammalian hearts according to the species [*2*, *4*, *8*, *16*, *21*]. Cardiac myosin is also species-specific from an immunological viewpoint [*13*]. Physiological and biochemical data derived from comparisons of myosin from left and right ventricles and from ventricles and atria are scarce and to some extent, controversial. The present work compares left and right ventricular and atrial myosin ATPases and their light subunits in seven species of mammals, including one wild one—the hare, in order to determine whether cardiac muscle contains different types of myosin.

Supported by Grant 5366 387670 from INSERM.

* Address for reprint requests.

Dedicated to Richard J. Bing M.D. on his 70th birthday.

0022-2828/79/101129+07$02.00/0 © 1979 Academic Press Inc. (London) Limited.

2. Materials and Methods

Hearts were taken from adult rats (*Rattus norvegicus*), rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), cats (*Felis domestica*), hares (*Lagomorpha*), dogs (German shepherd), pigs and cows (both from the slaughter house). Protein determination, sodium dodecylsulphate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and myosin preparation were performed as described earlier [*17*]. Ventricular myosin was purified by ammonium sulphate precipitation occurring between 34 and 50% saturation.

Ca^{2+}-activated ATPase was assayed in 10 mM $CaCl_2$, 0.025 M KCl, 5 mM ATP, 0.2 mg/ml of myosin, 0.1 M Tris HCl pH 7.5, for 5 min at 27°C [*17*]. K^+-dependent ATPase was assayed in 1 mM EDTA, 0.5 M KCl, 5 mM ATP, 0.1 M Tris HCl pH 7.5 for 5 min at 27°C.

The reaction of myosin with dithio-bis-nitrobenzoic acid (DTNB) was initiated according to Gazith *et al.* [*3*].

The molecular weight of light myosin subunits was determined by SDS gel electrophoresis using protein markers.

3. Results

Myosin ATPase

As previously shown [*2*, *16*, *21*], the Ca^{2+}-ATPase activity of myosin from both ventricles and atria was usually higher in small than in large animals, except for the only wild species studied—the hare (Table 1). In the latter, myosin Ca^{2+}-ATPase was about four times more active than in the domestic rabbit. K^+-ATPase activity, on the other hand, remained almost unchanged from one species to another.

When myosins from the left and right ventricles or atria of different species were compared, no differences were observed for either Ca^{2+}- or K^+-dependent ATPase. Comparison of ventricular and atrial myosins in the same species (in this case hare, dog, pig and cow) always revealed higher ATPase activity in the atrial myosin (Table 1). Interestingly, this difference applied to both Ca^{2+}- and K^+-ATPase.

Light myosin subunits

In all the species studied, the weights of the two light myosin subunits in each ventricle were identical (26 000 and 18 000 respectively), as shown by polyacrylamide gel electrophoresis (Plate 1). However, the molecular weights of these subunits in the atria (24 000 and 20 000 respectively, as determined in the hare, dog, pig and cow) were not the same as in the ventricles. In addition, we found that one atrial light subunit could be eliminated by DTNB (Plate 1).

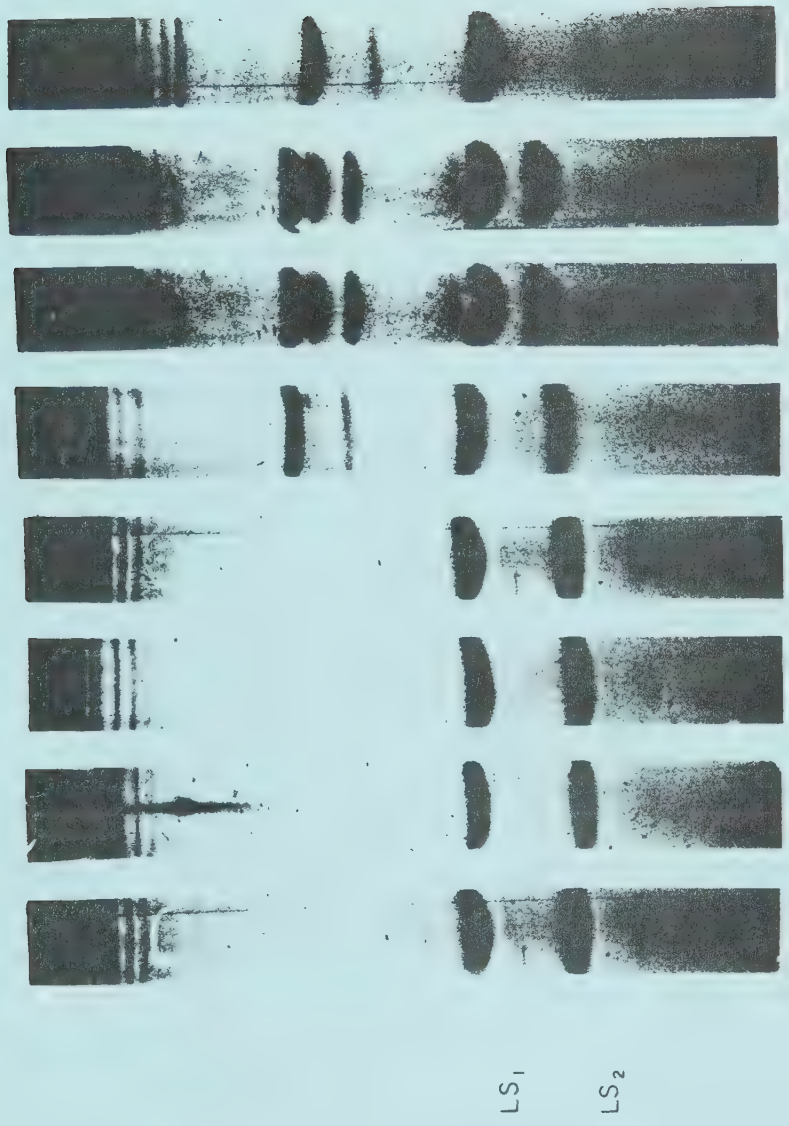


PLATE 1. Sodium dodecylsulphate polyacrylamide (10%) gel electrophoresis of ventricular and atrial myosin. Twenty micrograms of each protein were applied. (1) Rat, right ventricle; (2) rat, left ventricle; (3) pig, right ventricle; (4) pig, left ventricle; (5) pig, left ventricle (ammonium sulphate fractionation omitted); (6) pig, right atrium; (7) pig, left atrium, and (8) pig, right atrium (myosin treated with dithio-bis-nitrobenzoic acid).

[*facing page* 1130]

TABLE 1. ATPase activity of myosin from ventricles and atria in nmoles of Pi/min. mg^{-1}

Source of myosin	Rat	Hare	Cat	Rabbit	Dog	Pig	Cow
Ca^{2+}-ATPase activity							
Right ventricle	1.12 ± 0.05	1.24 ± 0.08	0.38 ± 0.02	0.34 ± 0.02	0.43 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.28 ± 0.03
Left ventricle	1.08 ± 0.15	1.08 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.33 ± 0.02	0.39 ± 0.04	0.34 ± 0.03	0.25 ± 0.03
Right atrium		1.47 ± 0.09			0.70 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.43 ± 0.04
Left atrium		1.49 ± 0.09			0.74 ± 0.04	0.54 ± 0.07	0.44 ± 0.02
K^{+}-ATPase activity							
Right ventricle	0.81 ± 0.05	0.93 ± 0.11	0.83 ± 0.07	0.82 ± 0.06	0.88 ± 0.07	0.58 ± 0.05	0.58 ± 0.03
Left ventricle	0.91 ± 0.06	0.81 ± 0.08	0.94 ± 0.10	0.82 ± 0.09	0.90 ± 0.09	0.60 ± 0.06	0.52 ± 0.03
Right atrium		1.33 ± 0.10			1.34 ± 0.15	1.06 ± 0.06	0.78 ± 0.07
Left atrium		1.33 ± 0.06			1.33 ± 0.12	1.05 ± 0.13	0.75 ± 0.05

In all cases three preparations of myosin were made. Then necessary, pooled material was used. Mean $\pm$ S.E.M. Differences in Ca^{2+}- and K^{+}-ATPase activity in atrial and ventricular myosin were all significant ($P < 0.05$) in the same species. Differences between the left and right parts of the heart were not significant. Pi = inorganic phosphate.

4. Discussion

Species differences

The generally accepted correlation between the size of the adult animal and the activity of ventricular myosin Ca^{2+}-ATPase [*2*, *16*, *21*] is confirmed by the present results. As far as domestic animals are concerned these findings show that the smaller the animal, the higher the ATPase activity (Table 1) and the faster the heart's contraction speed [*4*]. However, this was not so in the hare, a wild species in which ventricular myosin ATPase activity was about four times that of the rabbit (Table 1), even though hare heart was much heavier than rabbit's. This might mean that the cardiac shortening speed is faster in the hare than the rabbit, but such a difference seems unlikely, since the rabbit's heart rate is more than three times the hare's, and since in phylogeny, the heart rate usually correlates with the shortening speed. In reality, myosin ATPase activity seems adapted to the animal's physical activity, which obviously constitutes the most salient difference between the hare and rabbit. Such a disparity further suggests that the adaptive process might also affect a system other than the sarcomere itself, such as some step in calcium transport.

No data have so far been published concerning species differences of atrial myosin. In the present work, comparison of Ca^{2+}-ATPase activity in myosins from cow and hare atria showed that the activity varied in the same proportion as the corresponding activity of myosin from these animals' ventricles (Table 1).

Left and right ventricular myosin

The shortening speed of different parts of the ventricle has not yet been reported, and the only approaches which have so far provided relevant information on this problem are studies of papillary muscles or experiments on isolated cell preparations. However, the contraction velocity of the right and left ventricles have never been examined in the same animal, nor have isolated preparations been used to clarify this question.

From the biochemical point of view, two contradictory papers have been published. In one of them, Kleid *et al.* [*6*] found no differences between myosin from the left and right ventricles of rat, and in the other, Wikman-Coffelt [*20*] working on dogs (type not specified), observed that K^+- and Ca^{2+}-ATPase both dropped by 25% in the right ventricle compared to the left. In our study, no differences was found between myosin ATPase activity in the left and right ventricles of seven animal species.

Wikman-Coffelt [*20*] reported some difference between the relative amounts of the two light myosin subunits present in each ventricle. However, according to the

present findings, the proportions of these subunits seem much the same in the myosin from both ventricles (Plate 1), although, unlike Wikman-Coffelt, we did not estimate them quantitatively. The electrophoretic pattern of ventricular myosin light subunits invariably comprised two bands with the same mobility in all the species studied. This does not indicate chemical identity of corresponding subunits in different species. Light myosin subunits have been shown to have different amino acid composition in cattle, rabbit, pig, human and calf heart [*7*, *8*] and differences have also been found in these units' primary structure (J. J. Léger, C. Klotz and M. Elzinga, personal communication).

Ventricular and atrial myosin

The only clear-cut difference observed between myosin from different parts of the heart is that between ventricles and atria. Both Ca^{2+}- and K^{+}-ATPase activities were higher in atrial myosin, but the size of the difference varied depending on the species. Thus, the activity of atrial Ca^{2+}-myosin ATPase exceeded the corresponding ventricular activity by a factor of 1.28 in the hare, and by factors of 1.7, 1.6 and 1.6 in the dog, pig, and cow respectively. Atrial K^{+}-myosin ATPase was also more active by factors of 1.5, 1.5, 1.8, and 1.4 in the hare, dog, pig and cow respectively.

Like Ca^{2+}-myosin ATPase, atrial K^{+}-myosin ATPase also varies from one species to another, and these variations were accompanied by changes in the molecular weight of the light subunits. This is in agreement with the data of Long [*9*] who observed a different light subunit pattern when atrial myosin Ca^{2+}-ATPase activity increased, although K^{+}-ATPase activity diminished. Yazaki *et al.* [*22*] report similar results to ours, but found no differences in the light subunit pattern.

Interestingly, we found that the reducing agent dithio-bis-nitrobenzoic acid was able to eleminate one of the atrial light myosin subunits, but not one of the ventricular subunits [*5*, *10*, *12*, *20*]. Such elemination suggests that the atrial subunit concerned contains at least one SH group. Moreover, as shown by Yazaki *et al.* [*22*], atrial myosin ATPase was inactivated at alkaline pH. Thus, atrial myosin has many of the properties of fast myosin, but lacks a third light subunit. The fact that atrial myosin ATPase activity is higher than ventricular activity may be of physiological significance. Nordmann and Rüther [*11*], working on chick and rat embryos, and Cavanaugh [*1*], working on isolated cells, and Urthaler [*18*], using isolated trabeculae from adult dog heart, all showed that atrial muscle contracts faster than ventricular muscle.

It is of interest to emphasize that myosins from the same muscle in different species have different Ca^{2+}-ATPase but the same K^{+}-ATPase activity and the same light subunits structure. By contrast, all three factors are different when the myosins originate from different muscles, such as fast or slow skeletal muscles,

smooth muscle, ventricles or atria. Moreover, from an immunological point of view, species specificity is always more pronounced than muscle type specificity, at least in native myosin [*13, 14*].

In conclusion, the heart has at least two distinct types of myosin—atrial and ventricular. As in skeletal muscle, the Ca^{2+}-ATPase activity of cardiac myosin is highly species-specific and correlates with the speed of muscle shortening.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr P. Hnik for his help in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Cavanaugh, M. W. Pulsation, migration and division in dissociated chick embryo heart cells *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology* **138**, 573–580 (1955).
2. Delcayre, C. & Swynghedauw, B. A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* **355**, 39–47 (1975).
3. Gazith, J., Himmelfarb, S. & Harrington, W. F. Studies on the subunit structure of myosin. *Journal of Biological Chemistry* **245**, 15–22 (1970).
4. Henderson, A. H., Craig, R. J., Sonnenblick, E. H. & Urschel, C. W. Species differences in intrinsic myocardial contractility. *Proceeding of the Society of Experimental Biology and Medicine* **134**, 930–932 (1970).
5. Kendrick-Jones, J., Szentkiralyi, E. M. & Szent-Györgyi, A. G. Regulatory light chains in myosins. *Journal of Molecular Biology* **104**, 747–775 (1976).
6. Kleid, J. J., Tada, M., Repke, D. I. & Katz, A. M. Myosins from rat right and left ventricles. Comparison of ATPase activities and light fragments released by 8 M-urea. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **4**, 625–632 (1972).
7. Klotz, C., Aumont, M. C., Leger, J. J. & Swynghedauw, B. Human heart myosin ATPase and light subunits. *Biochimica et biophysica acta* **386**, 461–469 (1975).
8. Leger, J. J., Berson, G., Delcayre, C., Klotz, C., Schwartz, K., Leger, Joc., Stephens, M. & Swynghedauw, B. Heart contractile proteins. *Biochimie* **57**, 1249–1273 (1975).
9. Long, L., Fabian, F., Mason, D. T. & Wikman-Coffelt, J. A new cardiac myosin characterized from the canine atria. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **76**, 626–635 (1977).
10. Murakami, V., Uchida, K. & Hiratsuka, T. Cardiac myosin from pig heart ventricle. Purification and enzymatic properties. *Journal of Biochemistry* **80**, 611–619 (1976).
11. Nordmann, M. & Rüther, A. Über die Schlagtätigkeit des explantieren Herzmuskels von Huhn und Ratte und ihre Beziehung zum Reitleitungs system. *Archiv für Experimetelle Zellforschung* **11**, 315–321 (1931).
12. Sarkar, S., Sreter, F. A. & Gergely, J. Light chains of myosins from white, red, and cardiac myosins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* **68**, 946–950 (1971).
13. Schwartz, K., Bouveret, P., Sebag, C. & Swynghedauw, B. Immunological study

ARTICLE 2

of cardiac and skeletal heavy meromyosin and myosin. *Biochimica et biophysica acta* **425**, 24–56 (1977).

14. Schwartz, K., Bouveret, P. & Sebag, C. Immunochemical evidence for structural homologies between mammalian cardiac and skeletal myosin. *FEBS Letters* **87**, 99–102 (1978).
15. Swynghedauw, B., Leger, J. J. & Schwartz, K. The myosin isozyme hypothesis in chronic heart overloading. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **8**, 915–924 (1976).
16. Syrovy, I. The relation between myosin adenosine triphosphatase activity and inactivation of myosin under alkaline conditions of heart muscles in mammals of different size. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* **356**, 87–92 (1975).
17. Syrovy, I. & Gutmann, E. Differentiation of myosin in soleus and extensor digitorum longus muscle in different animal species during development. *Pflügers Archiv. European Journal of Physiology* **369**, 85–89 (1977).
18. Urthaler, F., Walker, A. A., Hefner, L. L. & James, S. T. N. Comparison of contractile performance of canine atrial and ventricular muscle. *Circulation Research* **37**, 762–771 (1975).
19. Weeds, A. G. & Pope, B. Chemical studies on light chains from cardiac and skeletal muscle myosins. *Nature* **234**, 85–88 (1971).
20. Wikman-Coffelt, J., Fenner, C., Smith, A. & Mason, D. T. Comparative analyses of the kinetics and subunits of myosins from canine skeletal muscle and cardiac tissue. *Journal of Biological Chemistry* **250**, 1257–1262 (1975).
21. Yazaki, Y. & Raben, M. S. Cardiac myosin adenosine triphosphatase of rat and mouse. Distinctive enzymatic properties compared with rabbit and dog cardiac myosin. *Circulation Research* **35**, 15–23 (1974).
22. Yazaki, Y., Veda, S. & Shimida, K. The distinctive enzymatic properties of cardiac atrial myosin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **9** (Suppl.), 44 (1977).

MYOSIN SYNTHESIS AND ENZYMATIC PROPERTIES DURING THYROXINE INTOXICATION IN RABBITS

C. DELCAYRE, B. SWYNGHEDAUW

SUMMARY

Hyperthyroidism has been induced in rabbits by a daily subcutaneous injection of D-L thyroxine (0.3 mg/kg). The ventricular myosin Ca^{2+} ATPase was increased after one week and reached + 100 % after two weeks while the K^+ EDTA ATPase remained normal. During the same period, the heart weight, and the myosin incorporation of ^3H-lysine after a four hour period of labelling had increased in parallel. The enhancement of both the Ca^{2+} ATPase and the labelling of myosin correlate, which suggests the appearance of a new molecule during the course of intoxication. This biochemical abnormality was unchanged after treatment with propranolol.

KEY-WORDS : Cardiac myosin - Hyperthyroidism - Myosin synthesis - Heart hypertrophy.

RÉSUMÉ

Modification de la synthèse et des propriétés enzymatiques de la myosine au cours de la cardiothyréose expérimentale chez le lapin. — Des lapins sont rendus hyperthyroïdiens grâce à une injection quotidienne sous-cutanée de D-L thyroxine (0,3 mg/kg). La Ca^{2+} ATPase de la myosine ventriculaire augmente dès la première semaine pour atteindre + 100 % après 15 jours alors que la K^+ EDTA ATPase reste inchangée. Durant la même période, le poids du cœur et l'incorporation de 3H-Lysine dans les myofibrilles cardiaques 4 heures après injection de lysine marquée, augmentent parallèlement. L'augmentation de la Ca^{2+} ATPase et celle du marquage des myofibrilles sont corrélées, ce qui suggère l'apparition d'une nouvelle molécule de myosine durant l'intoxication. Ces modifications restent inchangées après traitement au propranolol.

MOTS-CLES : Myosine cardiaque - Hyperthyroïdisme - Synthèse de la myosine - Hypertrophie cardiaque.

INTRODUCTION

It is wellknown that the increase in cardiac output observed during clinical or experimental hyperthyroidism is a consequence of both tachycardia and increase of stroke volume (review in Freedberg, 1974). The excess of cardiac output over the increase in oxygen consumption and the increased stroke volume suggest an enhanced cardiac contractility which has been evidenced by several authors *in vivo* by measuring the systolic ejection time or the isovolumic contraction time as well as *in vitro* on papillary muscle. Using this preparation Buccino (1967), Goodkind (1974), Gunning (1974), Pannier (1968), Skelton (1973), Strauer (1975) have shown that the maximum velocity of shortening, the time to peak tension, and the rate of tension development were all enhanced after at least (Skelton, 1973) 1 week of thyroxine treatment.

Such an increase in myocardial contractility occuring after a latent period suggests a deep change in the biochemical structure of the myocardial cell which does not depend on the presence of the hormone itself and, according to Hoch (1974), which can be classified as an effect of thyroxine and not

Unité de Recherches sur le Métabolisme du Cœur et des Vaisseaux de l'INSERM, Hôpital Lariboisière, 41, boulevard de la Chapelle, 75475 PARIS Cedex 10 (France).

Supported by grant CL 74510906 from INSERM.

Manuscript received January 25, 1978.

DELCAYRE C., SWYNGHEDAUW B. — Myosin synthesis and enzymatic properties during thyroxine intoxication in rabbits. **Path. Biol.**, 1979, **27**, n° 1, 36-40.

as an action of the hormone. Two intracellular systems can roughly be responsible of such an effect : the Ca^{2+} transport, as already suggested by W. Nayler (1971) and by Conway (1976) and the contractile proteins, which are studied in this work.

The myosin ATPase (ATP phosphohydrolase E.C.3.6.1.3.) specific activity correlates with the contractility in heart as well as in skeletal muscle as shown in phylogeny by Barany (1967) and by one of us (Delcayre, 1975). The aim of this work was to show if such a correlation does also occur in hyperthyroidism as suggested by several authors (Thyrum, 1970, Yazaki, 1975), if it is due to the synthesis of a new molecule and if the biochemical parameters can be altered by the beta-blockers, a well-known treatment of hyperthyroidism (review in Freedberg, 1974).

MATERIAL AND METHODS

Rabbits were male Albinos New Zealand of 2.7 kg. Four groups have been studied. 1) The rabbits were injected 0.3 mg/kg/day of D-L Na^+ thyroxine subcutaneously every morning during 2, 4, 8 or 15 days. 2) Some of the rabbits which have been intoxicated during 15 days were sacrificed 4 or 7 days after the treatment has been arrested. 3) 6 rabbits did simultaneously receive during 10 days 0.3 mg/kg/day of D-L Na^+ thyroxine and 10 mg/kg/day of propranolol (gift of I.C.I. laboratory). The propranolol was dissolved in saline and injected IV twice a day (at 10 a.m. and 5 p.m.). Each injection was followed by a wash of the vein with saline in order to avoid local oedema. 4) The controls have been matched according to their body weights and received saline. Some rabbits have been injected with propanolol without any thyroxine treatment.

Four hours before sacrifice, each rabbit was injected IV by 50 micro Ci/kg of H^3-lysine (14 Ci/mMole). The heart rate was registered 15 mn before sacrifice without anesthesia, into the slaughter house with an electrocardiograph. The rabbit was then killed with a blow on the head, the heart was quickly excised, blotted, and the ventricles were weighed. The percentage of ventricular hypertrophy has been computed using a regression line previously published (Swynghedauw, 1973) : Heart weight = 1.04 Body weight + 1.97.

The coronary arteries have then been perfused with a relaxing solution (Swynghedauw, 1973) and the ventricular myosin was extracted and purified according to Shiverick (1975) with a maximal yield of 10 mg/g of fresh tissue. On Na-dodecyl-sulfate gel electrophoresis (Cummins, 1973) myosin did not contain more than 5 % of actin. The 280 nm/260 nm ratio was comprised between 1.3 and 1.6.

The ATPase specific activity was measured at + 27 °C during 5 mn in the presence of 2 mM adenosine-triphosphate (ATP) - 0.1 mg/ml of myosin - 10 mM $CaCl_2$ (Ca^{2+}-ATPase) or 0.5 M KCl - 2,5 mM ethylene diamino-tetra-acetic acid (K^+-EDTA-ATPase) - 20 mM Tris-HCl pH 7.6.

The phosphate was determined according to Rockstein (1951), and the protein by the Folin method (Lowry, 1951).

For radioactivity measurements, 1 mg of myosin was solubilized in 10 ml of instagel (Packard). The counting was performed on an Intertechnique scintillation counter SL 30. The results were expressed in c.p.m./mg of myosin. In these conditions, as also shown by Kimata and Morkin (1971) in rabbits, 95 % of the radioactivity in myosin was found in the lysine.

RESULTS

During the intoxication, the animals lose weight by 10 % (initial body weight : 2.75 Kg ± 0.3 ; body weight after 2 weeks of intoxication : 2.47 Kg ± 0.2) and several of them died (1/10) after 10 days. Tachycardia and ventricular hypertrophy were obvious within 6-8 days (fig. 1) and after two weeks the ventricular weight and the heart rate both had in-

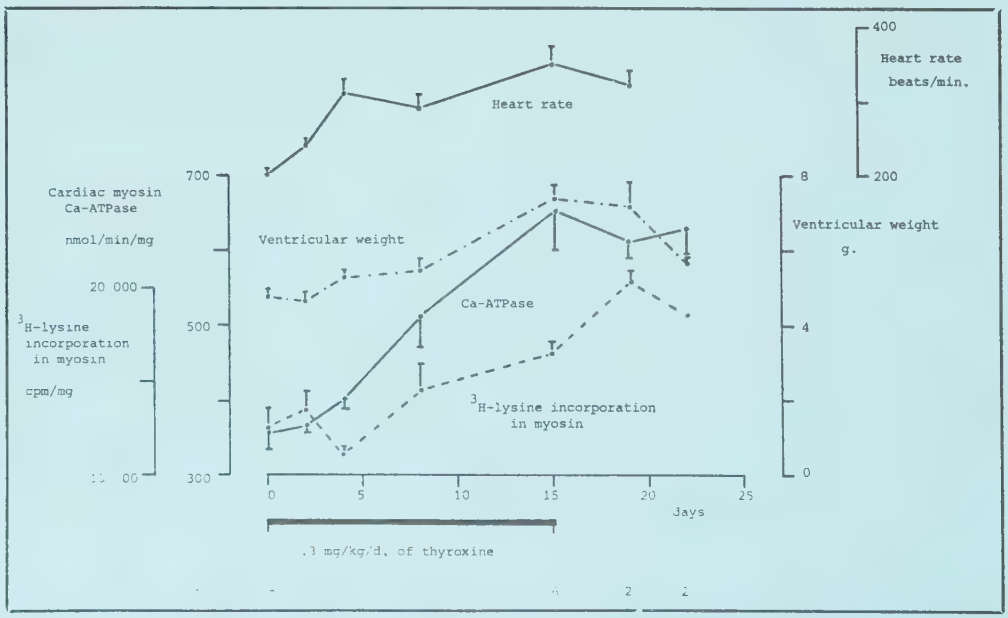


Fig. 1. — Effects of thyroxine intoxication on heart rate, weight, cardiac myosin Ca^{2+} ATPase, and incorporation of ^{3}H-lysine in the myosin.

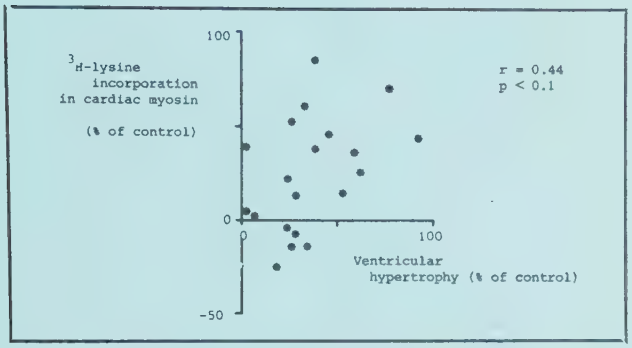


Fig. 2. — Effect of thyroxine intoxication on cardiac myosin. Correlation between ventricular hypertrophy and the incorporation of ^{3}H-lysine in myosin after a four hours period of labelling.

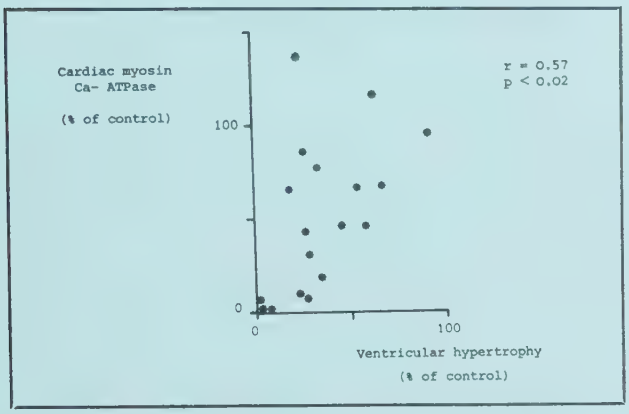


Fig. 3. — Effect of thyroxine intoxication on cardiac myosin. Correlation between ventricular hypertrophy and the myosin Ca^{42} ATPase.

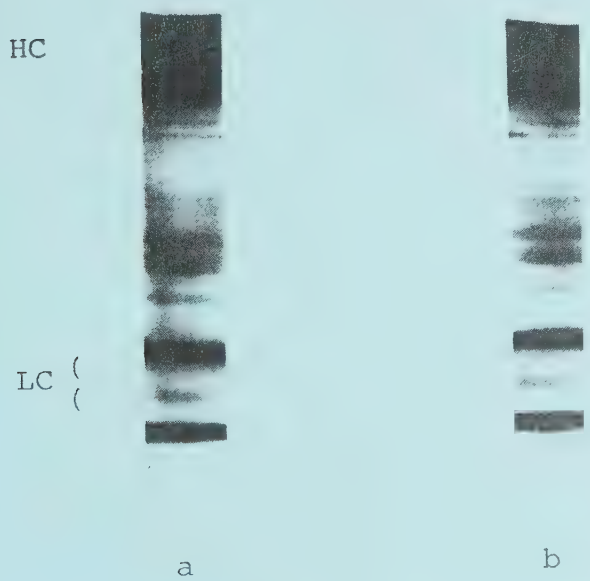


Fig. 4. — Polyacrylamide gel electrophoresis of cardiac myosin from : a) normal, and : b) thyrotoxic rabbit (600 µg each). HC : myosin heavy chains. LC : myosin light chains.

creased by 50 %. When the cardiac hypertrophy has been calculated using the body weight of the animal when sacrificed it is still more obvious, since the animals do grow lean, and reaches + 64 % ± 7. The cardiac hypertrophy and heart rate correlate ($r = 0.91$, $p < o.01$).

With the increase in heart weight there is an enhancement of ^{3}H lysine incorporation into myosin. Although scattered the results were significant and meant increase in myosin synthesis since the time elapsed between sacrifice and injections was not long enough to enable a significant lysis or reincorporation (Kimata, 1971). Both increase in heart weight and increase in amino acid incorporation correlate (fig. 2).

The specific activity of ventricular myosin Ca^{++}AT Pase increases by the 4th day and reaches twice its original value after two weeks, but the K^+ - EDTA ATPase is unchanged (604 ± 12 — 636 ± 18 — 605 ± 16, 651 ± 24, 642 ± 14 — nmole/mg min^{-1} before and after 2, 4, 8 and 15 days of intoxication). The Ca^{2+} - ATPase activity correlates with the ventricular weight (fig. 3) and with the ^{3}H-lysine incorporation ($r = 0.43$, $p < 0.1$). The myosin light and heavy subunits look normal in Na^+-dodecyl-SO^4 or in 8M urea gel electrophoresis (fig. 4).

The Ca^{2+} ATPase remains still elevated one week after the treatment has been interrupted in contrast with the ventricular weight and the labelling of myosin which decrease significantly.

Propranolol did not change the heart weight and the Ca^{2+} ATPase, or the labelling of myosin (table I). It affects heart rate which decreases by 20 % after 1 hour and during 3 hours both in normal and thyrotoxic rabbits. The heart rate returns to normal in the morning before the thyroxine injection.

DISCUSSION

The striking alteration of myosin ATPase which has been observed correlates with heart weight and heart rate. An interesting feature is that the only Ca^{2+} ATPase was increased although the K^+ ATPase was normal. Indeed it is well known that only the former was also changed when fast or slow skeletal or cardiac muscle were compared, or after cross-innervation, exercise or cardiac overloading (Bhan, 1975, Buller, 1969, Swynghedauw, 1973). It is now obvious that the Ca^{2+} ATPase has the same physiological signification than the Mg^{2+} ATPase of myofibrils or actomyosin and in fact when both were measured they both correlated (Barany, 1967). Of course such a correlation between intrinsic contractility of a muscle and the myosin activity does not eliminate the role of other parameters. For example the cross innervation of fast and slow

TABLE I. — **Effect of propanolol on thyroxine-induced changes in myosin AT Pase. Each group was treated during 8 days. Means ± S.E.M. Number of experiments in brackets.**

	Heart rate beats min	Ventricular hypertrophy °o	Myosin Ca-ATPaSE nmol min. mg	Myosin K-ATPase nmol min. mg	^{3}H-lysine incorporation in myosin cpm mg
a) Control	205 ± 8	0	355 ± 23	604 ± 13	12.317 ± 1 075
	(12)		(8)	(14)	(4)
b) Propranolol	215 ± 27	− 3 ± 3	342 ± 21	597 ± 54	12.300 ± 3 000
10 mg kg d	(4)	(4)	(4)	(4)	(2)
c) Thyroxine	281 ± 17	38 ± 6	522 ± 38	651 ± 24	14.731 ± 1 525
0.3 mg kg d	(12)	(9)	(3)	(3)	(5)
d) Thyroxine +	238 ± 14	34 ± 4	603 ± 15	621 ± 57	14.000 ± 1 200
propranolol	(6)	(4)	(4)	(4)	(2)
pa vs. b	N.S.	N S	N S.	N.S.	N.S
a vs. c	< 0.01	< 0 01	< 0 01	N S.	< 0 05
c vs. d	N S.	N S	N.S.	N.S.	N.S.

muscles does not only change the myosin ATPase but also the activity of several glycolytic mitochondrial enzymes and even the molecular weight of the sarcoplasmic reticulum ATPase (Pette, 1976). It is very likely that such a change affecting the cell as a whole occurs in hyperthyroidism, several of them such as an increase in alpha-glycerophosphate dehydrogenase (Isaacs, 1969) are well known, others, such as a modification of the sarcoplasmic reticulum are still controversial (Nayler, 1971, Conway, 1976).

This modification of myosin occurs after one week of thyroxine intoxication which correlates with the increase in cardiac contractility index, indeed it is now well established that thyroxine does not either change cardiac contractility on an isolated perfused heart (Skelton, 1973), or after the last 4 or 5 days of injections (Goodkind, 1974) ; conversely all the indexes or the maximum initial speed of shortening of the papillary muscle were sharply increased after 1 or 2 weeks. Nevertheless the problem is not entirely clear since it exists at least one species, the rat, in which the cardiac contractility and the heart weight were enhanced (Taichman, 1970) while the myosin ATPase remained normal (Yazaki, 1975). Other species differences have already been reported (Zaimis, 1969) which suggests that the mechanism of the thyroxine induced hyper contractility was not univalent.

Very few papers up to now have been published on the thyroxine-induced increase in myosin ATPase and they are in some ways contradictory. The increase observed by Thyrum (1970) and Goodkind (1974) in guinea pig or by Conway (1976) in dog was rather small (+ 30 %) compared to that observed in this paper and that published by Yazaki (1973) in the rabbit (+ 100 %). Two types of explanation are possible : a modification of a lateral group of the molecule or a change of the whole myosin itself. Although the molecular weight of the subunits (fig. 4), the amino acid composition of the light or heavy chains (Yazaki, 1975, Banerjee, 1976) were normal, this second explanation looks very likely : 1) the increase of Ca^{2+} ATPase which is normally observed when 2 SH groups have been blocked does not exist in thyrotoxic myosin (Banerjee, 1976) ; 2) as shown figure 1 the Ca^{2+} ATPase correlates with the increase in labelling of myosin which suggests the appearance of a new molecule.

The molecular change which has been observed can be a consequence of the effect of the hormone on nuclear ribonucleic acid synthesis as for several other enzymes. This is a long story discussed in detail elsewhere (Tata, 1974). But there is another possible explanation. It is now well established that exercise or acute overloading alone may induce an increase in myosin ATPase in the heart (Bhan, 1975, Wikmann-Coffelt, 1975) therefore it is possible to hypothesize that the increase in basic metabolic rate itself can induce an increase in cardiac work and then synthesis of a new myosin having a more active ATPase

We tried to control at least to some extent, the heart work be a treatment involving the beta-blockers. Propranolol did not change by itself the myosin ATPase either in control or in thyrotoxic rabbits. Although this experiment does not definitely eliminate the hypothesis, because propranolol did not normalize heart rate, and its action is of short duration (a few hours), a direct effect of the hormone at the nuclear level seems more likely than a simple consequence of an increase of heart work.

REFERENCES

BANERJEE S. K. FLINK I. L., MORKIN E. — Enzymatic properties of native and N-ethylmaleimide-modified cardiac myosin from normal and thyrotoxic rabbit. *Circulat. Res.*, 1976, *39*, 319-326.

BARANY M. — ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. gen. Physiol.*, 1967, *50*, 197-216.

BHAN A. K., SCHEUER J. — Effects of physical training on cardiac myosin ATPase activity. *Amer. J. Physiol.*, 1975, *288*, 1178-1182.

BUCCINO R. A., SPANN F. J., POOL P. E., SONNENBLICK E. H., BRAUNWALD E. — Influence of the thyroid state on the intrinsic contractile properties and energy stores of the myocardium. *J. clin. Invest.*, 1967, *46*, 1669-1682.

BULLER A. J., MOMMAERTS W. F. H. M., SERAYDARIAN K. — Enzymic properties of myosin in fast and slow twitch muscles of the cat following cross-innervation. *J. Physiol.*, 1969, *205*, 581-597.

CONWAY G., HEAZLITT R. A., FOWLER N. O., GABEL M., GREEN S. — The effect of hyperthyroidism on the sarcoplasmic reticulum and myosin ATPase of dog hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1976, *8*, 39-51.

CUMMINS P., PERRY S. V. — The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.*, 1973, *133*, 765-777.

DELCAYRE C., SWYNGHEDAUW B. — A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. *Pflügers Arch.*, 1975, *355*, 39-47.

FREEDBERG A. S., HAMOLSYK M. W. — Effect of thyroid hormone on certain non endocrine organ systems. *In* : Handbook of physiology ». Section 7, vol. 1 : the thyroid. Greer M. A., Solomon D. H. American physiological society, Washington D.C., 1974, 435-468.

GOODKIND M. J., DAMBACH G. E., THYRUM P. T., LUCHI R. J. — Effect of thyroxine on ventricular myocardial contractility and ATPase activity in guinea-pig. *Amer. J. Physiol.*, 1974, *226*, 66-72.

GUNNING J. F., HARRISSON C. E. Jr, COLEMAN H. M. — Myocardial contractility and energetics following treatments with D-thyroxine. *Amer. J. Physiol.*, 1974, *226*, 1166-1171.

HOCH F. L. — Metabolic effects of thyroid hormones. *In* : « Handbook of physiology ». Section 7, vol. 1 : the thyroid. Greer M. A., Solomon D. H. American physiological society, Washington D.C., 1974, 391-412.

ISAACS G. H., SACKTOR B., MURPHY T. A. — The role of the α-glycerophosphate cycle in the control of carbohydrate oxydation in heart and in the mechanism of action of thyroid hormone. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 1969, *177*, 196-203.

KIMATA S., MORKIN E. — Comparison of myosin synthesis in heart and red and white skeletal muscles. *Amer. J. Physiol.*, 1971, *221*, 1706-1713.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. — Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 1951, *193*, 265-275.

NAYLER W. G., MERRILLES N. C. R., CHIPPERFIELD D., KURTZ J. B. — Influence of hyperthyroidism on the uptake and binding of calcium by cardiac microsomal fractions and on mitochondrial structure. *Circulat. Res.*, 1971, *5*, 469-482.

PANNIER J. L. — The influence of thyroid hormone on myocardial contractility. *Arch. int. Physiol.*, 1968, *76*, 477-490.

PETTE D., MULLER W., LEISNER E., VRBOVA G. — Time dependent effect on contractile properties, fibre population, myosin light chains and enzymes of energy metabolism in intermittent by and continuous stimulated fast twitch muscles. *Pflügers Archiv.*, 1976, *364*, 103-112.

ROCKSTEIN M., HERRON P. W. — Colorimetric determination of inorganic phosphate in microgram quantities. *Analyt. Chem.*, 1951, *23*, 1500-1501.

SHIVERICK K. T., THOMAS L. L., ALPERT N. R. — Purification of cardiac myosin. Application to hypertrophied myocardium. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 1975, *393*, 124-133.

SKELTON C. L., KARCH F. E., WILDENTHAL K. — Lack of acute effects of thyroid hormones on myocardial contractility. *Amer. J. Physiol.*, 1973, *224*, 957-962.

STRAUER B. E., SCHERPE A. — Experimental hyperthyroidism. II. Mechanics of contraction and relaxation of isolated myocardium. *Basic. Res. Cardiol.*, 1975, *70*, 130-141.

SWYNGHEDAUW B., KLOTZ C., LEGER J. J., PRETESEILLE M. — Heart myosin adenosine triphosphatase and light subunits in experimental chronic aortic insufficiency in the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1973, *5*, 501-514.

TATA J. R. — Growth and developmental action of thyroid hormones at the cell level. *In* : « Handbook of physiology ». Section 7, vol. 1 : the thyroid. Greer M. A., Solomon D. H. American physiological society, Washington D.C., 1974, 469-478.

TAICHMAN G., KORECKY B. — Contractile state of the whole heart after hormonal intervention. *Fed. Proc.*, 1970, *29*, 321.

THYRUM P. T., KRITCHER E. M., LUCHI R. J. — Effect of L-thyroxine on the primary structure of cardiac myosin. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, 1970, *197*, 335-336.

WIKMAN-COFFELT J., FENNER C., WALSH R., SALEL A., KAMIYAMA T., MASON D. T. — Comparison of mild versus severe pressure overload on the enzymatic activity of myosin in the canine ventricles. *Biochem Medicine*, 1975, *14*, 139-146.

YAZAKI Y., RABEN M. S. — Effect of the thyroid state on the enzymatic characteristics of cardiac myosin. A difference in behavior of at and rabbit cardiac myosin. *Circulat. Res.*, 1975, *36*, 208-215.

ZAIMIS E., PAPADAKI L., ASH A. S. F. — Cardiovascular effects of thyroxine. *Cardiovasc. Res.*, 1969, *3*, 118-133.

2. LES MODIFICATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES DE LA MYOSINE

Les résultats présentés dans le paragraphe précédent montrent que l'ATPase de la myosine varie significativement dans plusieurs conditions, en liaison avec la contractilité. Les mécanismes transcriptionnels pouvant expliquer de telles variations seront abordés dans la discussion. Les travaux qui suivent avaient pour but de tester l'implication d'un mécanisme post-transcriptionnel, la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, dans le contrôle de l'activité ATPase. Le tableau IV montre que le phosphorylation de la chaîne légère ne varie pas sous l'influence de stimulations à court terme. Cette étude a donc été effectuée par une approche nouvelle. L'originalité de ce travail consiste à se placer dans une situation pathologique, dans laquelle des modifications biochimiques importantes existent au niveau de l'appareil contractile.

Les expériences décrites montrent que le niveau de phosphorylation de la chaîne légère et l'activité de la myosine kinase ne sont pas modifiés dans le coeur hypertrophié. Ces deux résultats sont cohérents et suggèrent la non-intervention de ce système de phosphorylation dans l'adaptation cardiaque à la surcharge chronique.

Le marquage de la myosine kinase et de la calmoduline par immunofluorescence indique que ces deux protéines sont réparties de manière homogène et similaire sur le réseau filamentaire. Elles peuvent donc jouer un rôle, qui reste à déterminer.

Enfin, une nouvelle activité kinase Ca^{2+}- et calmoduline-dépendante a été identifiée dans le coeur de rat. Elle ne semble pas modifiée dans le coeur hypertrophié.

2.1. Etude de la myosine kinase dans le coeur de rat normal et hypertrophié

(Article 4 : Delcayre C, Swynghedauw B, Samuel JL, Bertier B, Marotte F, Rappaport L (1983) soumis pour publication).

L'hypertrophie cardiaque est obtenue chez le rat, comme décrit en détail dans l'article 4, par double intervention aortique selon la technique de Jouannot et al. (1973). Les coeurs, sélectionnés chez des rats ne

présentant pas de signes d'insuffisance cardiaque, ont un pourcentage d'hypertrophie de 50 à 100 %. La myosine kinase est purifiée environ 600 fois avec un rendement de 6 % par chromatographie sur échangeur d'ions puis chromatographie d'affinité sur colonne de calmoduline-sepharose. L'activité myosine kinase, mesurée par incorporation du ^{32}Pi dans la chaîne légère de myosine en présence de Ca^{2+} et calmoduline, est identique chez les animaux témoins et hypertrophiés (article 4, figure 1 à 4) et de l'ordre de 7 nmol P. min^{-1}. mg^{-1}.

Article 4

Unchanged myosin kinase activity in hypertrophied rat heart.

UNCHANGED MYOSIN KINASE ACTIVITY IN HYPERTROPHIED RAT HEART

DELCAYRE Claude*, SWYNGHEDAUW Bernard, SAMUEL Jane-Lise, BERTIER Bénédicte, MAROTTE Françoise and RAPPAPORT Lydie.

From : Unité 127 INSERM, Hopital Lariboisière, 41 Boulevard de la Chapelle, 75010 Paris, France.

Running title : Myosin kinase activity in heart hypertrophy.

KEY-WORDS : myosin kinase ; cardiac hypertrophy ; calmodulin-activated kinases ; myosin light chain phosphorylation

Abbreviations used : MK : myosin kinase ; ATPase : ATP phosphohydrolase (E.C. 3.6.1.3.) ; SDS : sodium dodecyl sulfate ; EDTA :ethylene diamine tetraacetic acid:EGTA : ethylene-bis (oxyethylene nitrilo) tetra acetic acid.

* : to whom correspondence should be sent . Tél. (1) 285 80 65

SUMMARY

The decrease in myosin ATPase activity observed in cardiac hypertrophy induced by chronic overload has been related to an isoenzymic redistribution of myosin. To test the hypothesis of an additional regulation of myosin ATPase through light chain phosphorylation, we measured the myosin kinase (MK) activity together in sham-operated and 50-100 % hypertrophied rat hearts.

The MK were purified approximately 600 fold with 6 % yield by ion exchange chromatography and calmodulin-affinity chromatography. The presence of very important levels of proteolytic activity in the rat heart resulted in a partial loss of the MK calmodulin-dependency. The major component from both MK purified fractions was a 63 kdaltons protein. The protein content was identical in MK purified fractions from sham-operated and hypertrophied hearts. The calmodulin-dependent activity of MK, assayed in the presence of 0.1 mM Ca^{2+} and 10^{-6} M calmodulin (about 6.7 nmol P/min . mg), was identical in sham-operated and 50-100 % hypertrophied hearts. Thus, MK specific activity, in these conditions, was unchanged in rat heart chronic hypertrophy.

This result suggests that no direct functional relationship exits between the enzymatic properties of myosin and myosin kinase during the chronic phase of cardiac hypertrophy.

INTRODUCTION

It is generally admitted that short time changes in the contractile state of cardiac muscle occur mainly as a result of changes in either the rate or the amount of Ca^{2+} released from intracellular storage sites. In heart, the Ca^{2+}-induced acto-myosin activation is mediated by the troponin-tropomyosin system (review in 1). However, an additional mechanism, by which changes in Ca^{2+} fluxes might affect muscular contractility, has been described in different types of muscle. The myosin 20 k Da light subunit (P-light chain) can be phosphorylated, in vivo and in vitro, by a Ca^{2+}-and calmodulin-dependent myosin kinase (MK)(review in 9), and dephosphorylated by a phosphatase (32). Both enzymes were described to be highly specific for the myosin P-light chain. In heart, MK was purified (34, 39, 41) , and evidenced on heart sections by the means of a fluorescent anti-smooth muscle MK antibody (16).

The P-light chain phosphorylation has been related to the actomyosin ATPase activation in smooth muscle (review in 9), or to the potentiation of post-tetanic twitch tension (22) and the actomyosin turnover rate in fast twitch whole muscle (11), or skinned fibers (8). On the other hand, the association between contractile performance and myosin light chain phosphorylation in cardiac muscle is unclear. Attemps to correlate the steady state level of cardiac myosin light chain phosphorylation with the inotropic response have usually involved perfusion experiments in which increases in inotropy were induced by β - agonists or high Ca^{2+} concentrations. In these conditions, no modification in myosin P-light chain phosphorylation was observed in either isolated perfused heart (17, 18, 19, 40) or cardiac skinned fibers (21).

However, Resink et al., (35) observed, in running training experiments, changes in the myosin P-light chain phosphate content. In in vitro experiments, Bhan et al. (5) showed that the P-light chain phosphorylation level could modulate the ATPase activity of cardiac actomyosin.

In cardiac hypertrophy induced by chronic overload, actomyosin ATPase activity is decreased (review in 37). These changes have been related in rats (27, 29) and in rabbits (26) to a change in the isoenzymic pattern of myosin. The present work was undertaken to determine whether an additional regulation of cardiac myosin could also exist through light chain phosphorylation in this model. We purified and compared the activities of MK from normal and highly hypertrophied (50 to 100 %) rat hearts. The enzyme activities were found to be identical in both situations.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatment

Wistar male rats were provided food (Extralabo M 25 pellets) and tap water ad libitum. Heart hypertrophy was induced in 180 to 220 g animals, by an aortic stenosis followed by aortic insufficiency as described by Jouannot et al. (20). The treated rats were matched to sham-operated rats with respect to the weights. The rats were stunned by a blow to the head. The hearts were rapidly excised, and freed from atria and great vessels. The ventricles were opened, briefly rinsed in cold saline, blotted dry and weighed. The magnitude of heart hypertrophy in treated animals was estimated by comparison to a regression curve:ventricles weight versus body weight,established in 37 sham-operated animals. For each rat, the theoretical weight of the ventricles was : ventricles weight (g) = (1.66 x body weight + 180) x 10^{-3}. The magnitude of the hypertrophies obtained varying from 40 to 120%,hearts exhibiting degrees of hypertrophy from 50 to 100 % were pooled, thus providing a rather homogenous sample. The hearts showing less than 50 % of hypertrophy were discarded.

Materials

All chemicals were reagent grade. The proteolytic inhibitors were purchased from Sigma chemical Co. (δ-^{32}P);ATP was obtained from New England Nuclear; DEAE-Sephacel and Sepharose 4B were obtained from Pharmacia Fine Chemicals Inc. The molecular weight markers for electrophoresis and gamma-globulin standard for protein assay were purchased from Bio-Rad Laboratories. Trifluoperazine dihydrochloride was a generousgift fromTheraplix laboratories (Paris, France).

Purification of myosin kinase

All procedures were carried out at 0-4°C unless otherwise specified. Each experiment involved the parallel purification of MK from the same amount of ventricular tissue from sham-operated and hypertrophied rats. The amount of fresh ventricular tissue usually available for one experiment was around 10 g, i.e. 6 to 8 hypertrophied hearts, or 10 to 14 control hearts. The ventricles were minced with scissors, and crushed in a glass-teflon homogenizer at 0°C, with 3 volumes of 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 4 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride and benzamidine, 10 ug/mL of soybean trypsin inhibitor, benzoylarginine ethylester and M-tosyl phenylalanine chloromethyl ketone, 1 ug/mL of pepstatin A and leupeptin (buffer A), made 0.25 M with respect to sucrose. The homogenates were centrifuged at 35,000 x g for 30 min. The supernatants from sham-operated and hypertrophied hearts were applied to columns (1.5 x 5.0 cm) of DEAE-sephacel previously equilibrated with buffer A. The columns were washed with buffer A and eluted with a 20 mL linear KCl gradient (0 to 0.5 M KCl) made up in the buffer A. The flow rate was 8 mL/h. The MK activities were assayed in the eluted fractions, and the fractions containing the peak of activity were pooled (fractions I). The selected fractions were identical with respect to the initial and final elution KCl molarities for sham-operated and hypertrophied samples. The fractions I (about 6.0 mL) were dialyzed extensively against 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.2 mM $CaCl_2$, 3 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM of benzamidine and phenylmethylsulfonyl fluoride (buffer B), and further purified by affinity chromatography on a column (0.7 x 3.0 cm) of calmodulin coupled to sepharose 4 B, as described by Adelstein and Klee (1981). The calmodulin-bound proteins were eluted from the column with the buffer B containing 0.2 M NaCl and 2 mM EGTA.

The volume of collected fractions was 250 uL and the flow rate was 8 mL/h. The MK activity was assayed in the eluates and the active fractions pooled (fractions IV).

Preparation of other proteins

Myosin light chains were prepared from rabbit white skeletal muscle or beef cardiac myosin as described in (33). They were kept frozen at -40°C, for up to 6 months. A partially purified calmodulin-free light chain fraction was obtained by ion-exchange chromatography essentially as described in (31). Calmodulin was prepared from ram testis according to (4).

Protein determination

Protein concentrations were determined by using the macro and the micro assays devised by the Bio-Rad laboratories, based on the method of Bradford (6).

Myosin kinase assay

MK activity was measured by the amount of $^{32}P_i$ incorporated in the myosin P-light chain. The assay mixture contained 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM magnesium acetate 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM $CaCl_2$ or 2.5 mM EGTA, 0.5mM γ-^{32}P ATP (80 cpm/pmol), 1 to 8 mg/ml of myosin light chains, and 0 or 10^{-6} M calmodulin. 10^{-4}M trifluoperazine was added in some experiments. The incubations were performed at 30 °C for 2 to 10 min. The reaction was started by addition of the enzymatic fraction (12 µl), and stopped by pipetting an aliquot of the mixture (60 µL) onto Whatman 3MM filter paper discs which were then washed as described in (10). The radioactivity was measured by scintillation counting. Enzymatic activities were expressed as mean $\pm$ S.D.. Statistical differences between mean values for two groups were evaluted by t-test.

Electrophoresis and autoradiography

Electrophoresis of proteins was carried out using 7 to 15 % polyacrylamide gradient slab gels, run in the buffer system of Laemmli (24). The gels were stained by the Coomassie blue or silver nitrate (30) method. They were then destained, dried under vacuum and exposed to Kodak X-O-Mat AR film, for 24 to 48 h at -70°C with the aid of Dupont lightning plus intensifiyng screens (25). The densitometric scannings of the gels and autoradiograms were done by using a Vernon PHI 5 densitometer (Vernon Instruments, Paris, France). The linearity of film darkening as a function of radioactivity has been checked, and all the autoradiograms were in the linear zone.

RESULTS

1/ MK activity in homogenate supernatant.

The MK activities were measured, as described in methods. No significant difference was observed between the control (sham-operated) (12.6 ± 6.1 pmol P/min . mg protein) and treated (50-100 % hypertrophied) hearts (14.8 ± 5.9 pmol P/min.mg protein).

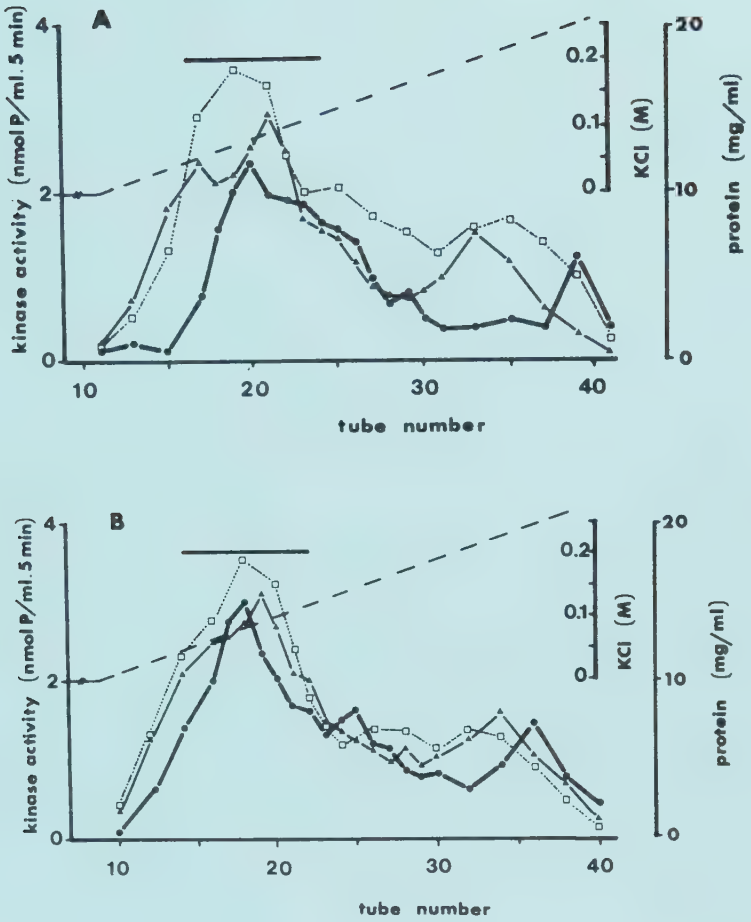
2/ Purification of MK activity by ion exchange chromatography.

Kinase activity was assayed in the presence of 10^{-6} M calmodulin (see methods) in the fractions eluted from DEAE-sephacel chromatography of the supernatants from control hearts (Fig. 1 A). The incubations performed without addition of myosin light chains evidenced a kinase activity phosphorylating cardiac endogenous substrates (Fig. 1 A, triangles). The MK activity was assayed by the addition of crude myosin light chains in the incubation medium ; the values obtained after subtraction of the endogenous phosphorylation gave the activity of the enzyme (Fig. 1A, circles). As seen in figure 1, the two kinase activities were eluted together when submitted to chromatography on DEAE-sephacel. When hypertrophied heart extracts were analyzed, the elution profiles of these two kinases were very similar to the controls (Fig. 1B) : MK activities from both control or hypertrophied hearts were eluted at 80 mM KCl.

Fractions from control and treated samples eluted between 40 and 120 mM KCl were pooled and referred to as fraction I (Fig. 1, under the bar). Figure 2 shows that the incorporation of ^{32}Pi into myosin light chains (4 mg/mL), catalyzed by fractions I , was linear for 4 min. The MK activities measured in the presence of both 0.1 mM Ca^{2+} and 10^{-6}M calmodulin, were 78.2 ± 21.6 and

Figure 1 : Chromatography of calmodulin-activated kinase activities from rat heart extracts on DEAE-Sephacel.

The homogenate supernatants (about 20 mL) prepared from sham operated (A) or hypertrophied (B) rat hearts as described in methods were separately applied to columns (1.5 x 5.0 cm) of DEAE-Sephacel previously equilibrated with 40mM Tris-HCl (pH 7.6), 4 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, and the mixture of protease inhibitors described in the methods section. The columns were developed with the buffer containing a linear gradient of KCl and 1.0 mL fractions were collected. The kinase activities were assayed, as described in methods, in the presence of both 0.1 mM Ca^{2+} and 10^{-6}M calmodulin, and expressed by the ^{32}Pi incorporated into either cardiac endogenous substrate (▲——▲) or exogenous myosin P-light chain (●——●). □·····□ : protein concentration. The fractions under the bar were pooled and referred to as fraction I .


A
kinase activity (nmol P/ml.5 min)
KCl (M)
protein (mg/ml)
tube number
B
kinase activity (nmol P/ml.5 min)
KCl (M)
protein (mg/ml)
tube number

86.0 ± 17.4 pmol P/min. mg protein (n = 5 ; respectively control and treated samples) , i.e. they were not significantly different. In both cases, the ion-exchange chromatography produced an about 5 times enhancement of the MK specific activity.

The MK activities from both control and treated samples were inactivated by about 65 % in the presence of 10^{-4} M of the calmodulin-inhibitor trifluoperazine (Fig. 2), or 2 mM of the Ca^{2+}-chelator EGTA (not shown). To verify that the observed MK inactivation was only secondary to the absence of free calmodulin able to activate the enzyme, these incubations were carried out in standard conditions, with purified (i.e. free from calmodulin) myosin P-light chain as substrate. This experiment confirmed the results obtained with trifluoperazine, i.e. the MK activity was inhibited to about the same extent, either in the absence of calmodulin, or in the presence of 2 mM EGTA.

3/ Purification of MK activity by calmodulin-affinity chromatography.

The proteins with a specific calmodulin-binding site were selectively retained on a calmodulin-sepharose column, and eluted with EGTA (Fig. 3). The fractions II (flow-through)and III (not specifically retained) showed no significant MK activity. The presence of MK activity was detected in the fractions eluted with 2 mM EGTA (fraction IV). The MK activity profiles from both control (Fig. 3A) or treated samples (Fig. 3B) were similar.

4/ Analysis of purified MK activities

Figure 4 depicts the phosphorylation of cardiac or skeletal myosin light chains by the purified fractions of MK from either control (Fig. 4A) or treated samples (Fig. 4B), as a function of time. At different times of the assay, aliquots of the incubate were analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel and autoradiography. When skeletal light chains were used as the

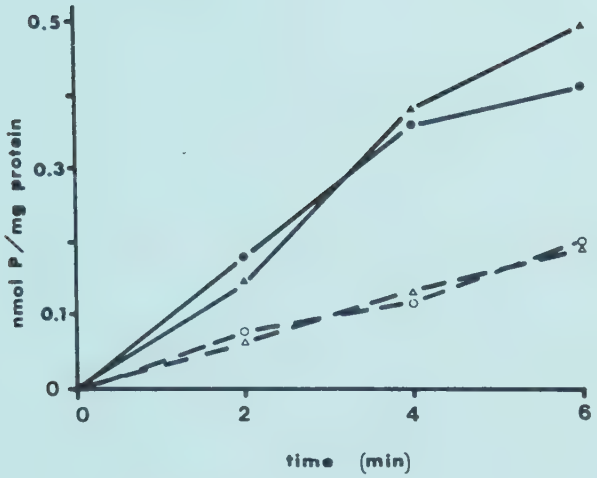
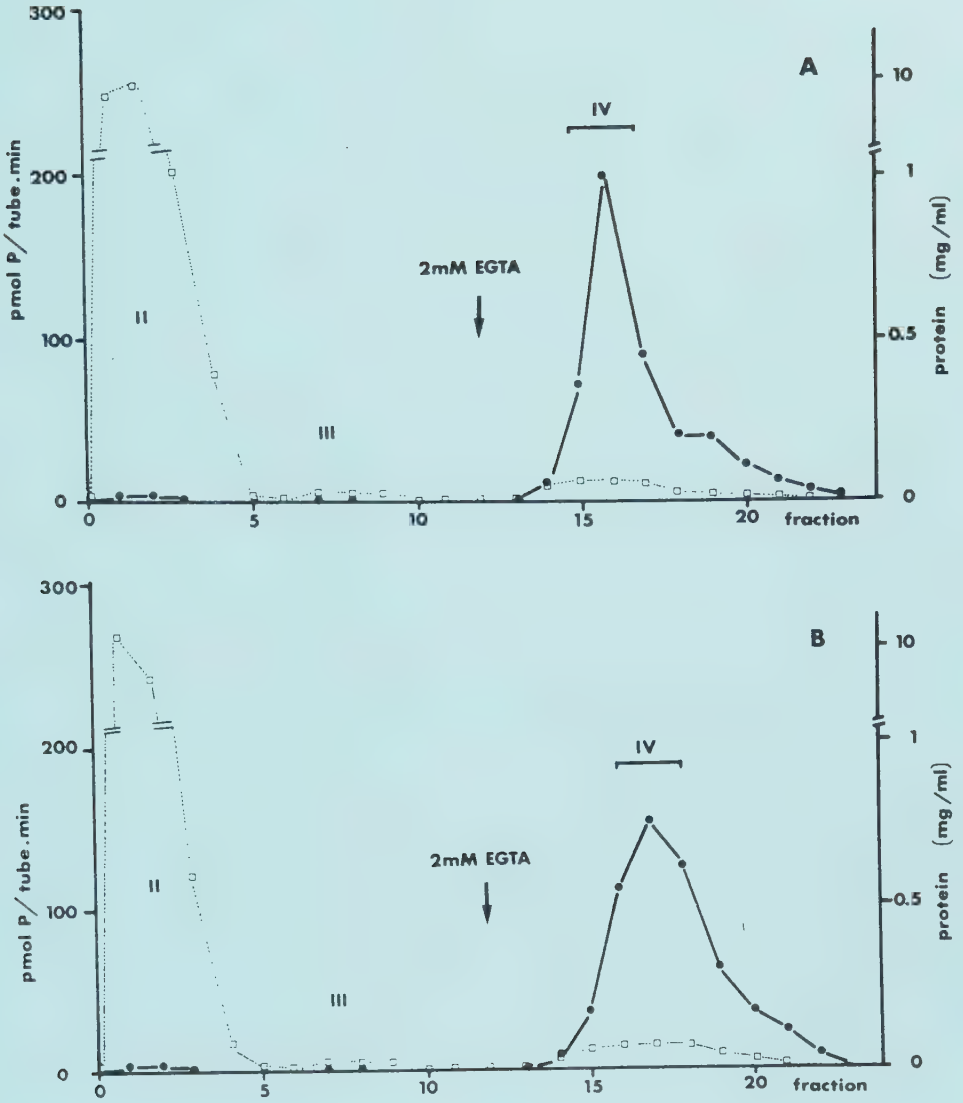


Figure 2 : Kinetics of cardiac myosin light chains phosphorylation by fraction I.from chromatography on DEAE-Sephacel.

The reactions were carried out as described in methods using cardiac whole myosin light chains (4 mg/mL) as substrate, in the presence of both 0.5 mM γ-32P-ATP and 0.1 mM Ca^{2+} and either 10^{-6}M calmodulin (● , ▲), or 10^{-4}M trifluoperazine (○ , △), and an aliquot of fraction I from chromatography on DEAE Sephacel from sham-operated (● , ○) or hypertrophied (▲ , △) rat hearts.

Figure 3 : Chromatography of myosin kinase on calmodulin-sepharose 4B.

The fractions I (about 6.0 mL) from DEAE-Sephacel chromatography from sham-operated (A) and hypertrophied (B) rat hearts, equilibrated with 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.2 mM $CaCl_2$, 3 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol,0.5 mM of benzamidine and phenyl methylsulfonyl fluoride, were separately applied to columns (0.7 x 3 cm) of calmodulin-sepharose 4B. The columns were washed with 30 vol. of equilibrating buffer, followed by 10 vol. of the same buffer containing 0.2 M NaCl. Myosin kinases were eluted with 2 mM EGTA in the buffer containing 0.2.M NaCl. Myosin kinase activity (●—●) was assayed by using cardiac whole myosin light chains in the presence of 10^{-6}M calmodulin and 0.1 mM Ca^{2+} as described in methods. The volumes of the collected fractions were respectively 5.0, 2.0, and 0.3 mL for fractions 0-5, 6-11 and 12-23. The fractions under the bar were pooled and referred to as fraction IV ; □.... □ : protein concentration.


A
B
IV
2mM EGTA
II
III
pmol P/ tube.min
protein (mg/ml)
fraction
300
200
100
0
10
1
0.5
0
5
15
20

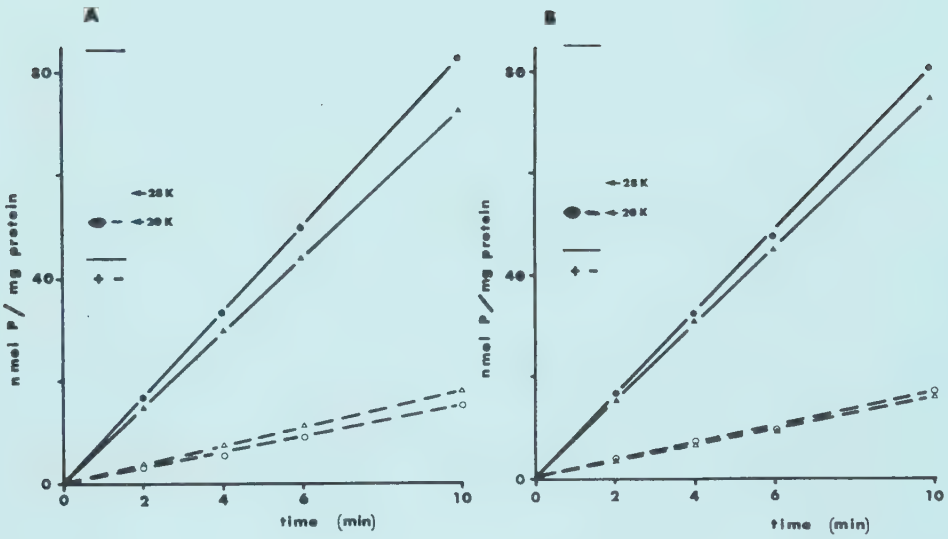


Figure 4 : Kinetics of phosphorylation of myosin light chains by purified myosin kinase from rat heart.

The reactions were carried out as described in methods using cardiac (● , ○) or skeletal (▲ , △) whole myosin light chains (4 mg/mL) as substrate, in the presence of both 0.5 mM γ- ^{32}P-ATP and 0.1 mM Ca^{2+} and either 10^{-6} M calmodulin (● , ▲) or 10^{-4}M trifluoperazine (○, △), and an aliquot of fraction IV from chromatography on calmodulin-sepharose 4B from sham-operated (A) or hypertrophied (B) rat hearts.

Inset : autoradiogram of the fraction IV incubated as described in methods in the presence of cardiac myosin light chains and in the presence (+) or absence (-) of 10^{-6}M calmodulin,and separated by 7-15 % polyacrylamide SDS-gel electrophoresis.

substrate, the 20 kDa P- light chain was the only phosphorylated protein (not shown). When light chains fraction was of cardiac origin, a protein of Mr 28,000 was slightly phosphorylated besides the 20 kDa myosin P-light chain. As shown in the insets of figure 4 (A and B), this phosphorylation of the protein of Mr 28,000,contaminating the light chain fraction,only occured in the presence of 10^{-6} M calmodulin. Both the densitometric scanning of this autoradiogram and the scintillation counting of the sliced destained gel indicated that 95 % of the total incorporated ^{32}Pi was associated with the myosin P-light chain, and 5 % with the 28 kdaltons protein. These relative values remained constant for incubation times from 1 to 10 min. Consequently, the evaluation of P-light chain phosphorylation obtained after scintillation counting was overestimated and had to be corrected by a factor of 5 %.

The MK purified fractions from control or treated hearts catalyzed the phosphorylation of cardiac or skeletal myosin P-light chains with very similar rates (Fig. 4A and B, solid lines).The ^{32}Pi incorporation into both types of light chains was linear for 10 min, either in the presence or in the absence of 10^{-6}M calmodulin. The MK activities measured in the presence of 0.1 mM Ca^{2+} and 10^{-6}M calmodulin, with cardiac light chains as the substrate, were respectively 8.2 nmol P/min.mg protein (sham-operated) and 8.0 nmol P/min.mg protein (50-100 % hypertrophied). In both cases, about 20 % of this MK activity was not inactivated in the presence of 10^{-4} M trifluoperazine (Fig. 4A and B, dotted lines). So, the calmodulin-dependent MK activities were obtained by subtracting the calmodulin-independent activities from the the total MK activities.

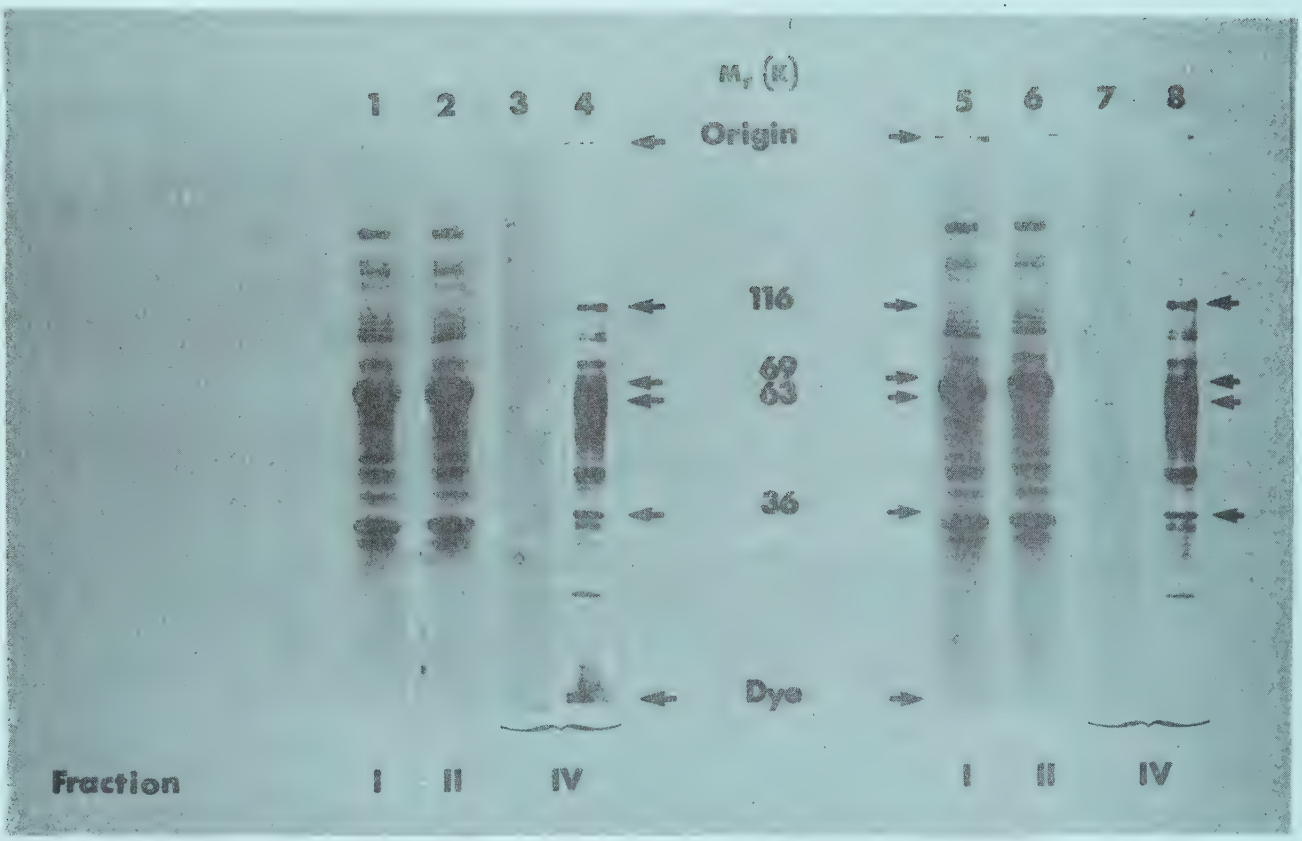


Figure 5 : Electrophoresis of the myosin kinase fractions from rat heart.

The fractions loaded on (fractions I, lanes 1 and 5) and eluted from (fractions II and IV, lanes 2 to 4 and 6 to 8) the calmodulin sepharose column were analyzed by 7-15 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis by using the buffer system of Laemmli (1970). The total amounts of protein applied to the gel were 25 µg (lanes 1-2 and 5-6) and 0.4 µg (lanes 3-4 and 7-8). The proteins were revealed by Coomassie blue coloration (lanes 1 to 3 and 5 to 7) or by silver nitrate coloration (lanes 4 and 8). Lanes 1 to 4 : sham-operated rat heart ; lanes 5 to 8 : hypertrophied rat heart.

They were respectively 6.7 (control) and 6.3 nmol P/min. mg protein (hypertrophied).

The enzymatic fractions obtained, from control and treated tissues, at various steps of the purification procedure were analyzed by SDS-gel electrophoresis (Fig. 5). The protein patterns of every fraction were visualized by the Coomassie blue staining, except in fractions IV (Fig. 5, lanes 3 and 7), in which the protein contents were so low that the more sensitive silver nitrate coloration (30) was used (Fig. 5, lanes 4 and 8). The fractions I and II from both samples were electrophoretically identical (Fig. 5, lanes 1-2 and 5-6), which was expected since fraction II (not retained by the calmodulin-sepharose) represents over 99 % of fraction I loaded on the column. The fractions IV from both samples displayed the same pattern, i.e. five major proteins of Mr 116,000, 69,000, 63,000, 59,000 and 36,000,and minor bands. The densitometric scanning (not shown) revealed that the relative contents of each protein in both control and treated samples were identical. In both cases, the five major proteins represented together 87 % of the total protein content. The major band of Mr 63,000 accounted for 61 % and the 116,000, 69,000, 59,000 and 36,000 Mr proteins for respectively 3.6, 6.4, 8.0 and 8.0 % of the total proteins.

Table I summarizes the recovery and activity of MK at the various steps for a typical purification of enzyme from sham-operated and 50-100 % hypertrophied rat hearts. The yields were very similar at each step of purification for control and treated samples. This allows us to compare directly the MK activities

TABLE I

Purification of Myosin Kinase from sham-operated (S) and 50-100 % hypertrophied (H) rat hearts (*)

		Total protein (mg) (†)	Total activity (pmol P_i/min)	Yield (%)	Activity/mg protein (pmol P/min.mg)	Purification (Fold)
Homogenate supernatant	S	457	5753	100	12.6	-
	H	405	5989	100	14.8	-
Fraction I (DEAE-sephacel)	S	70	4784	76	68	5.4
	H	62	4372	73	71	4.8
Fraction IV (Calmodulin-sepharose Total activity	S	0.055	449	7.8	8172	649
	H	0.054	429	7.2	7962	538
Calmodulin-dependent activity	S	0.055	369	6.4	6701	532
	H	0.054	339	5.7	6290	425

(*) Hypertrophy was incuced by aortic stenosis + aortic insufficiency

(†) Assayed by the method of Bradford (1976).

These results were obtained from one typical experiment, starting from 9.0 g of heart.

measured in both tissues. MK were purified approximately 650 fold (control) and 540 fold (treated) with yields of 7.8 and 7.2 respectively. This represents respectively 0.055 and 0.054 mg of protein obtained from 9.0 g of control and treated tissue.

In conclusion, we could not observe any difference in the yields of purification and the protein contents of fractions IV from both control and treated hearts. As the MK activities measured in both samples were also not significantly different, we concluded that the specific activities of MK from control and hypertrophied rat hearts were identical, when assayed in the presence of 10^{-6}M calmodulin and 0.1 mM Ca^{2+}.

DISCUSSION

Large hypertrophies were induced by the procedure of an aortic stenosis followed by an aortic insufficiency (see methods). This model corresponds to a chronic state of heart hypertrophy, secondary to both pressure and volume overload. Since the cardiac output is maintained to a normal value, the hypertrophied heart is considered to be adapted to the overload. A number of metabolic changes, and namely the myosin isoenzymic shift, are acquired (review in 37), which reflect the myocardial adaptation at the molecular level. Our results suggest that the MK is not involved in this long-terme metabolic adaptation of the heart to overload.

The MK from control and hypertrophied rat hearts were purified under such identical conditions that their activities could be compared. We adapted the purification methods of cardiac MK, requiring from 200g to 5 kg of muscle (34, 39, 41), to purify the enzyme from low amounts of tissue (about 10 g.). Two chromatography steps allowed us to reach a purification index of about 600 (Table I). In spite of the rather weak purification provided by the DEAE-sephacel chromatography, this step was requisite to separate the MK and the calmodulin. Indeed, a fraction free from calmodulin was required to clearly define the calmodulin-dependency of the MK, and for purification by calmodulin-affinity chromatography. The calmodulin-sepharose chromatography led to an about 100 fold increase in the MK specific activity. Indeed, less than 1 % of the loaded proteins were specifically retained by the column. Only 10 % of the loaded MK activity was recovered after the affinity chromatography (Table I). This low yield may be secondary to the fact that about 35 % of the MK activity subjected to affinity-chromatography was calmodulin-

independent. It is also quite possible that, during the time of dialysis and binding of the fraction to the calmodulin-sepharose (about 16 h), proteolysis still occured and, as suggested by Walsh et al. (39) led to a further loss of calmodulin-dependency (see below). That is probably why 20 % of the MK activity was still calmodulin-independent, when assayed after affinity chromatography (Fig. 4) ; a loss of calmodulin-dependency must occur during the time between elution and assay (about 3 h). These observations emphasize the difficulties encountered in the purification of MK from small quantities of heart tissue.

Myosin light chain phosphorylation was linear for only 4 min when catalyzed by fraction I (Fig. 2) and for at least 10 min when catalyzed by fraction IV (Fig. 4). As all substrates were in excess, in both conditions, it can be supposed that phosphatases or proteases still present in fraction I were partially eliminated from fraction IV.

Purified MK contained two types of activity. One was inhibited by the calmodulin-chelator trifluoperazine, whereas the other was neither inhibited by trifluoperazine nor by EGTA (Fig. 2 and 4). As calmodulin was eluted from the DEAE-sephacel column at about 0.3 M KCl, it is unlikely that the calmodulin-independent MK activity could be due to traces of calmodulin contaminating the enzyme preparation. As already discussed, MK was shown to be extremely sensitive to proteolysis, which gives rise to a Ca^{2+}-and calmodulin-insensitive enzymatic moiety (review in 38). On the other hand, the myocardium contains particularly high levels of proteolytic activity (15) , and especially the rat heart shows an about 3 fold higher alkaline proteolytic activity than dog or beef (14).In our hands,the absence of protease inhibitors in the buffers resulted in an

important relative increase of the calmodulin-independent MK activity, and a decrease in the recovery of the total activity (results not shown). That is why we carried out the purification of MK in the presence of a "cocktail" of protease inhibitors (see methods). Nevertheless, it is likely that some proteolytic enzymes still remained active, even after the calmodulin-affinity chromatography. The fraction IV was very unstable, i.e. variations in the protein pattern and loss of activity were observed soon after purification. The high level of proteolytic activities in cardiac tissue may explain the important discrepancies concerning either the molecular weight (65,000 to 95,000), the specific activity (7nmol to 20 µmol P/min.mg) or the regulation, by a phosphorylation process depending from either cAMP or calmodulin, of the MK purified from heart (34, 39,41,).This may also explain the contradictions of the results reported here with a previous communication (12) describing a difference in MK activity between control and hypertrophied rat heart. These previous and preliminary experiments were carried out without protease inhibitors, and results reflected more probably differences in endogenous proteolytic activities of control and hypertrophied tissues rather than variations in MK activities.

Rat heart MK phosphorylated the light chains from either cardiac or skeletal muscle myosin with the same rate (Fig. 4). This agrees with the previous observations from Walsh et al. (39) with bovine cardiac MK, but differs from the results described either by Wolf and Hofmann (41) with bovine cardiac MK or by Adelstein and Klee (2) with MK from smooth muscle, who concluded that heterologous myosin light chains were phosphorylated with a much lower rate. These variations in MK specificity towards myosin light chains may be related

to the specific activity of the enzyme. In our hands, MK from rat heart exhibited a specific activity of about 7 nmol P/min.mg protein. It ranged in the same order of magnitude that the one measured by Walsh et al. (39) in bovine heart (30 nmol P/min. mg), but was much lower than those reported by Wolf and Hofmann (41) in bovine heart (20 umol P/min.mg) and Adelstein and Klee (2) in smooth muscle (10-30 umol P/min.mg).

Another calmodulin-dependent protein kinase phosphorylating a 43,000 Mr endogenous protein was copurified with the MK (13). Its activity, as that of MK was not changed in chronic rat heart hypertrophy (unpublished results). So, we cannot conclude yet if the calmodulin-dependent phosphorylation of the 28, 000 Mr protein in the cardiac myosin light chain preparation (Fig 4, inset) was catalyzed by the MK or by the "43 k-kinase".

We found that the activities of purified MK from normal and treated hearts were similar. On the other hand, as the yields of purification from both enzymes and their protein patterns were identical, we assumed that the cellular contents in MK from both samples were very close. Finally, we concluded that, in the presence of an excess of calmodulin and Ca^{2+}, the specific activity of MK was unchanged in hypertrophied heart.

However, other parameters may control the activity of MK in vivo, such as the affinity for the calmodulin which could be modified by the phosphorylation state of the enzyme. Indeed, the affinity of MK from smooth muscle was shown to be decreased by a factor of 20 after phosphorylation of the enzyme by the cAMP-dependent protein kinase (7). Moreover, the calmodulin concentration or subcellar distribution may change during hypertrophy. The phosphorylation state of the myosin light chain depends also

on phosphatases (32), the specific activity of which may also be modified during hypertrophy. Study of the level of phosphorylation of P-light chain in normal and hypertrophied hearts could allow to better evaluate the role of phosphatases in the phosphorylation state of myosin light chains in cardiac muscle.

The MK activity we measured in rat heart was close to that of beef heart (39). This suggests that the P-light chains phosphorylation level is not related to the cardiac cycle, which is about 10 times shorter in rat than in beef. As discussed previously, short term stimulations do not affect the cardiac P-light chain phosphorylation level (17, 18, 19, 40). On the other hand, the myocardial content in MK activity is low in comparison with the other types of muscle (17, 19, 39). Taken together, these facts suggest that MK is not essential in the regulation of cardiac concentration. Considering the long-term stimulations, Resink et al. (35) reported an increase in cardiac myosin chain phosphorylation in running trained rats, and suggested a role for this system in the cardiac adaptation to the overload. On the other hand, Litten et al. (26) failed to observe any variation in the phosphate content of myosin light chain from thyrotoxic rabbit hearts. Ca^{2+}-activated myosin ATPase was increased by about 20 % in the trained rat hearts, but was about twice the normal in thyrotoxic rabbit hearts. In the rat, cardiac pressure plus volume overload leads to a decrease of the myosin ATPase of about 30 % (27), but the MK activity is unchanged (this work). So, in two of these three models of cardiac overload, the possible biochemical adaptations of the heart to chronic overload, revealed by a variation in myosin ATPase activity, did not involve the myosin

light chain phosphorylation system. Thus, the variation of the myosin phenotypic expression seems to be the only way by which myosin ATPase activity is changed in chronic mechanical overload.

It was recently proposed that myosin P-light chain could be involved in myosin filament assembly of smooth muscle (23).or non muscular systems (28, 36). If such a regulation exists in heart muscle, it should be more probably observed in the phase of muscle growth, i.e. during establishment of hypertrophy.

In conclusion, the function of myosin light chain phosphorylation in heart remains not clear. As it was previously shown not to be related to short-term regulatory mechanisms triggered by β-agonists or increased Ca^{2+} concentrations (17, 18, 19, 40), our results suggests that in rat heart, MK was not involved in an adaptation to chronic overload.

Acknowledgements : The authors express their thanks to Drs J G. Demaille, K. Schwartz and M.P. Walsh for helpful discussions, Dr. P.S. Cassidy for reading the manuscript, P. Cagnac for secretarial assistance, and Philippe Foundation for some financial support. They also thank J. Bercovici and Dr. J.J. Mercadier for performing the cardiac overloads. This work was supported in part by grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale (N° 82 5052).

REFERENCES

1. ADELSTEIN, R.S. and EISENBERG, E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. Ann. Rev. Biochem 49, 921-956 (1980).
2. ADELSTEIN, R.S. and KLEE, C.B. Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase. J. Biol Chem 256, 7501-7509 (1981).
3. ALPERT, N.R. and MULIERI, L.A. Heat, mechanics, and myosin ATPase in normal and hypertrophied heart muscle. Federation Proc 41, 192- 198 (1982).
4. AUTRIC, F., FERRAZ, C., KILHOFFER, M.C., CAVADORE, J.C. and DEMAILLE, J.G. Large scale purification of calmodulin from ram testis. Biochim Biophys Acta 631, 139-147 (1980) .
5. BHAN, A., MALHOTRA, A. SCHEUER, J., CONTI, M.A. and ADELSTEIN, R.S. Subunit function in cardiac myosin. J. Biol Chem 256, 7741-7743 (1981).
6. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-254 (1976).
7. CONTI, M.A. and ADELSTEIN, R.S. The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle kinase by the catalytic subunit of 3' : 5' cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem 256, 3178-3181 (1981).
8. COOKE, R., FRANKS, K. and STULL, J.T. Myosin phosphorylation regulates the ATPase activity of permeable skeletal muscle fibers. FEBS Lett. 144, 33-37 (1982).
9. COOKE, R. and STULL, J.T. Myosin phosphorylation. In : Cell and muscle motility, vol 1, edited by DOWBEN, R.M. and SHAY, J.W. New York, Plenum Press, pp 99-133 (1981).
10. CORBIN, J.D. and REIMANN, E.M. Assays of c clic AMP-dependent protein kinases. In : Methods in enzymology, vol. 38, edited by COLOWICK S.P and KAPLAN, N.O. New York. Academic Press, pp 287-290 (1974).

11. CROW, M.T. and KUSHMERICK, M.J. Myosin light chain phosphorylation is associated with a decrease in the energy cost for contraction in fast twitch mouse muscle. J. Biol Chem 257, 2121-2124 (1982).

12. DELCAYRE, C.,MAROTTE, F., BERCOVICI, J., SWYNGHEDAUW, B. and RAPPAPORT, L. Myosin light chain kinase activity in normal and hypertrophied rat heart (abstract). J. Mol Cell Cardiol 13, Supplement 1, 21 (1981.).

13. DELCAYRE, C., MAROTTE, F. and RAPPAPORT,L. Phosphorylation of a 43 kdaltons protein from rat heart by a calmodulin-dependent protein kinase. J Mol Cell Cardiol, in the press (1983).

14. DRABIKOWSI, W., GORECKA, A. and JACUBIEK-PUKA, A. Endogenous proteinases in vertebrate skeletal muscle. Int J Biochem 8, 61-67 (1977).

15. EDMUNDS, T. and PENNINGTON, R.J.T. Mast cell origine of myofibrillar protease of rat skeletal and heart muscle. Biochim Biophys Acta 661, 28-31 (1981).

16. GUERRIERO, V. Jr, ROWLEY, D.R. and MEANS, A.R. Production and characterization of an antibody to myosin light chain kinase and intracellular localization of the enzyme. Cell 27, 449-458 (1981).

17. HIGH, C.W. and STULL, J.T. Phosphorylation of myosin in perfused rabbit and rat hearts. Am J Physiol 239, H756-H764 (1980).

18. HOLROYDE, M.J., SMALL, D.A.P., HOWE, E. and SOLARO, R.J. Isolation of cardiac myofibrils and myosin light chains with in vivo levels of light chain phosphorylation. Biochim Biophys Acta 587, 623-637 (1979).

19. JEACOCKE, S.A. and ENGLAND, P.J. Phosphorylation of myosin light chains in perfused rat heart. Biochem J. 188, 763-768 (1980).

20. JOUANNOT, P., GOURDIER, B. and HATT, P.Y. L'hypertrophie cardiaque expérimentale du rat. Arch Mal Coeur Vx 66, 1067-1076 (1973).

21. KERRICK, W.G.L., HOAR, P.E., CASSIDY, P.S., BOLLES, L. and MALENCIK, D.A. Calcium regulatory mechanisms. Functional classification using skinned fibers. J. Gen Physiol 77, 177-190 (1981).

22. KLUG, G.A., BOTTERMAN, B.R. and STULL, J.T. The effect of low frequency stimulation on myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle. J Biol Chem 257, 4688-4690 (1982).

23. KORETZ, J.F. Effects of phosphorylation on the aggregation behavior of porcine aortic muscle myosin. (abstract) Biophys J. 33 : 235a (1981).

24. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).

25. LASKEY, R.A. and MILLS, A.D. Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Lett 82, 314-316 (1977).

26. LITTEN, R.Z. III, MARTIN, B.J ., LOW, R.B. and ALPERT, N.R. Phosphorylation and adenosine triphosphatase activity of myofibrils from thyrotoxic rabbit hearts. Circ Res 80, 856-864 (1981).

27. LOMPRE, A.M., SCHWARTZ, K. D'ALBIS, A., LACOMBE, G., VAN THIEM, N. and SWYNGHEDAUW, B. Myosin isoenzyme redistribution in chronic overload. Nature 282, 105-107. (1979).

28. MARTIN, F., GABRION, J. and CAVADORE, J.C. Thyroid myosin filament assembly is controlled by myosin light chain phosphorylation-dephosphorylation. FEBS Lett 131, 235-238 (1981).

29. MERCADIER, J.J., LOMPRE, A.M., WISNIEWSKY, C. SAMUEL, J.L., BERCOVICI, J., SWYNGHEDAUW, B. and SCHWARTZ, K. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. Circ Res 49, 525-532 (1981).

30. MERRILL, C.R., GOLDMAN, D., SEAMAN, S.A. and EBERT, M.H. Ultra sensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variations in cerebrospinal fluid proteins. Science 211, 1437-1438 (1981).

31. NAIRN, A.C. and PERRY, S.V. Calmodulin and myosin light chain kinase of rabbit fast skeletal muscle. Biochem. J. 179, 89-97 (1979).

32. PATO, M.D. and ADELSTEIN, R.S. Dephosphorylation of the 20,000 dalton light chain of myosin by two different phosphatases from smooth muscle J. Biol Chem 255, 6535-6538 (1980).

33. PERRIE, W.T. and PERRY, S.V. An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. Biochem J 119, 31-38 (1970).

34. RAPPAPORT, L. and ADELSTEIN, R.S. Phosphorylation of canine cardiac myosin light chain kinase. Federation Proc. 39 : 2041 (1980).

35. RESINK, T.J., GEWERS, W., NOAKES, T.D. and OPIE, L.H. Increased cardiac myosin ATPase activity as a biochemical adaptation to running training : enhanced response to catecholamines and a role for myosin phosphorylation. J Mol Cell Cardiol 13, 679-694 (1981).

36. SCHOLEY, J.M., TAYLOR, K.A. and KENDRICK-JONES, J. Regulation of non-muscle myosin by calmodulin-dependent light chain kinase. Nature 287, 233-235 (1980).

37. SWYNGHEDAUW, B. and DELCAYRE, C. Biology of cardiac overload. Pathobiology Annuals 12, 137-183 (1982).

38. WALSH, M.P. Calmodulin-dependent myosin light chain kinases. Cell Calcium 2, 333-352 (1981).

39. WALSH, M.P., VALLET, B., AUTRIC, F. and DEMAILLE, J.G. Purification and characterization of bovine cardiac calmodulin-dependent myosin light chain kinase.J. Biol Chem 254, 12136-12144 (1979).

40. WESTWOOD, S.A. and PERRY, S.V. The effect of adrenaline on the phosphorylation of the P-light chain of myosin and troponin I in the perfused rabbit heart . Biochem J 197, 185-193. (1981)

41. WOLF, H. and HOFMANN, F. Purification of myosin light chain kinase from bovine cardiac muscle. Proc Natl Acad Sci USA 77, 5852-5855 (1980).

2.2. Mesure du niveau de phosphorylation de L2 dans le coeur de rat normal et hypertrophié

La phosphorylation de L2 dépend de l'équilibre entre les activités de la myosine kinase et de la phosphatase. Les expériences décrites ci-dessous complètent donc la mesure de l'activité de la kinase.

Deux méthodes ont été successivement employées. La première est un dosage colorimétrique du phosphore dans une fraction de chaînes légères purifiées, qui s'est révélée inutilisable à cause de la présence de contaminants phosphorylés. La seconde, mise au point par Guy Berson, consiste à séparer les formes phosphorylée et déphosphorylée de la chaîne légère de myosine par électrophorèse puis isoélectrofocalisation.

2.2.1. Méthode 1

Les chaînes légères de la myosine cardiaque sont purifiées selon la technique de Frearson et al. (1976b), collectées par précipitation à l'acide trichloroacétique 10 %, lavées dans l'acide trichloroacétique comme décrit par Stull et Buss (1977) afin d'éliminer le Pi non lié aux protéines, et minéralisées selon la technique de Ames (1966). Le Pi lié aux protéines est dosé par colorimétrie selon la technique de Itaya et Ui (1966) utilisant le vert de malachite. Les protéines sont dosées par la méthode de Lowry et al. (1951).

La moyenne de 5 expériences effectuées sur du coeur de rat normal est de 2,23 $\pm$ 0,41 mole P/ mole L2, en admettant que L2 soit la seule protéine phosphorylée dans l'échantillon. Un lavage de la vaisselle de verre à l'acide nitrique éliminant la contamination par du Pi d'origine minérale, il est vraisemblable que l'échantillon peu purifié contient d'autres phosphoprotéines. La purification ultérieure de L2 à partir d'un coeur de rat est difficilement envisageable. D'autre part, le pourcentage de phosphorylation de L2 dans la préparation est mesuré par densitométrie après coloration des protéines au bleu de Coomassie, ce qui n'est correct que si toutes les protéines contenues dans l'échantillon présentent la même sensibilité au colorant. On sait que ce n'est pas le cas. Pour ces raisons, cette méthode a été abandonnée au profit de la suivante.

2.2.2. Méthode 2

Les myofibrilles sont préparées, à partir de coeur frais ou congelé dans l'azote liquide, selon une méthode mise au point au laboratoire par Guy Berson, dérivée de celle de Holroyde et al. (1979) qui permet d'inhiber les activités kinase et phosphatase pendant la phase de purification des chaines légères.

Un coeur de rat est homogénéisé 2 fois 5 sec à l'ultra-turrax à 2 °C, dans 15 volumes de tampon A contenant KH_2PO_4 50 mM/KOH (pH 7), NaF 70 mM, EDTA 5 mM, saccharose 0,3 M, PMSF 0,1 mM. L'homogénat est centrifugé 5 min à 5.000 x g et le culot est repris dans 15 volumes du même tampon sans saccharose et contenant triton X-100 qsp 1 % (tampon B). Après centrifugation 5 min à 5000 x g, le culot subit un autre lavage dans le tampon B, puis trois lavages dans le tampon B sans triton ni EDTA (tampon C). Le culot de myofibrilles est lavé deux fois dans le tampon d'électrophorèse (selon Laemmli 1970) froid dilué 5 fois, contenant DTT 1 mM et PMSF 0,1 mM. 1 volume de tampon pour électrophorèse bouillant, 2 fois concentré et contenant SDS 3 %, est ajouté au culot. Après adjonction d'eau qsp 3 mL, le tube est plongé dans l'eau bouillante pendant 2 min. Après centrifugation 4 min à 5.000 x g et adjonction de glycérol qsp 25 %, la solution peut etre conservée quelques jours à -20 °C.

La chaine légère L2 est isolée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon Laemmli (1970) et découpée au scalpel après coloration ou par comparaison avec des bandes témoin colorées. Le fragment de gel contenant L2 est rincé 10 min dans 1 mL d'urée 8 M, triton X-100 25 %, DTT 0,1 M puis déposé sur le gel d'isofocalisation. La séparation des formes phosphorylée et déphosphorylée est réalisée par isoélectrofocalisation, dans un tube de 0,3 x 12 cm, selon la technique de O'Farrell et al. (1977). L'intensité de la coloration des deux bandes de protéine est mesurée par densitométrie à l'aide d'un spectrophotomètre Gilford 2400. Les résultats sont exprimés en pourcent, la somme des deux pics représentant 100 %. La mesure du gradient de pH est effectuée en découpant des fragments de 0,5 cm sur un gel témoin. Ceci permet l'identification certaine de la forme phosphorylée de L2.

La figure 14 montre les bandes colorées obtenues, après séparation

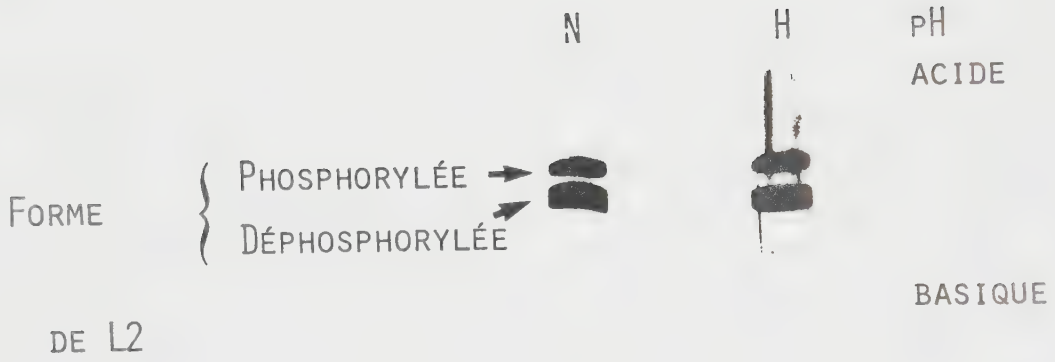


Figure 14 : Séparation des formes phosphorylée et déphosphorylée de la chaîne légère de coeur de rat normal (N) et hypertrophié de 100 % (H) par isofocalisation de la chaîne légère purifiée par électrophorèse.

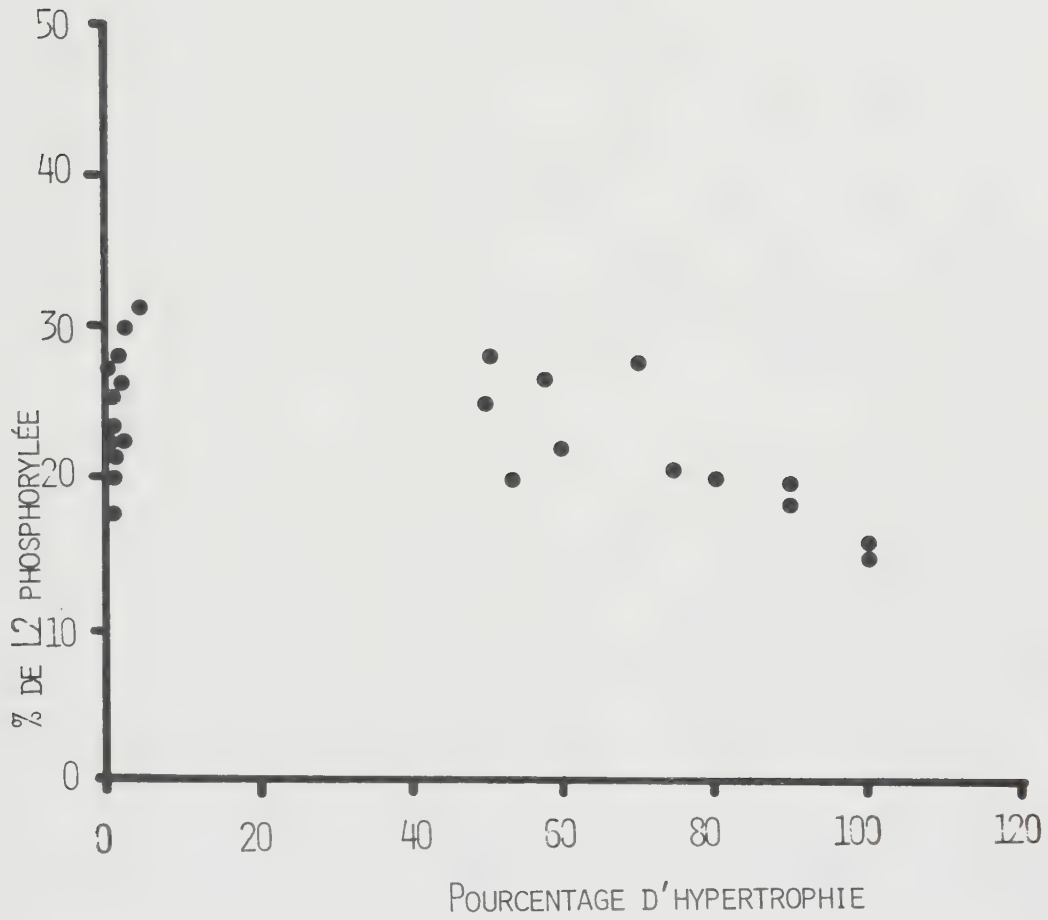


Figure 15 : Distribution du pourcentage de phosphorylation de la chaîne légère de coeur de rat en fonction de l'hypertrophie obtenue par double surcharge mécanique.

par isoélectrofocalisation, des formes phosphorylée et déphosphorylée de L2 provenant de coeur de rat normal et hypertrophié (100 %). La fraction déposée sur le gel de focalisation est pure et seulement deux bandes de protéine sont révélées par coloration.

Les résultats de ces expériences, réalisées en collaboration avec Guy Berson, sont présentés sur la figure 15. Les valeurs obtenues sur 11 coeurs de rat témoins et 12 coeurs de rat ayant une hypertrophie de 50 à 100 % sont les suivantes : le pourcentage de L2 phosphorylée est de 24,2 $\pm$ 4,2 % dans le coeur normal et 21,8 $\pm$ 4,4 % dans le coeur hypertrophié. L'analyse au moyen du test t montre que les deux populations ne sont pas statistiquement différentes à $p < 0,05$ ($t=2,14$).

2.3. Révélation de la myosine kinase et de la calmoduline par immunofluorescence

La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine ne peut avoir une signification physiologique que si le système est fonctionnel in vivo. La faible activité de la myosine kinase cardiaque conduit à poser la question de son existence en tant que constituant du sarcomère. Cavadore et al. (1982) ont montré qu'un anticorps anti-myosine kinase de muscle lisse se fixait sur la myosine kinase du muscle cardiaque, prouvant une homologie partielle de structure de ces deux protéines. L'étude de la répartition de la myosine kinase dans le sarcomère myocardique vient donc en complément des mesures biochimiques décrites précédemment. L'association de la calmoduline à l'apoenzyme est nécessaire à l'activation de la myosine kinase. Il était donc intéressant de savoir si la calmoduline présentait une répartition intracellulaire similaire à la kinase. La technique consistant à isoler les myocytes cardiaques permet d'obtenir une préparation qui respecte l'architecture interne de la cellule. La localisation de ces deux protéines a donc été comparée dans le myocyte cardiaque isolé de rat à celle de la myosine et de la desmine, dont les positions dans le sarcomère sont connues.

2.3.1. Préparation des myocytes isolés et techniques immunologiques

Les myocytes cardiaques isolés de rat sont obtenus par la technique de Cutilletta et al. (1977), modifiée par Samuel et al. (1983). La dissociation cellulaire est réalisée par perfusion cardiaque de collagénase en présence de Ca^{2+} 25 µM, sans adjonction de hyaluronidase. Les myocytes sont perméabilisés par Triton X-100 1 %, EGTA 10 mM, fixés par le formaldéhyde 3,7 %, lavés puis incubés en présence des anticorps comme décrit par Samuel et al. (1983).

L'anticorps anti-calmoduline de testicule de bélier a été obtenu chez le lapin et purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de calmoduline-sepharose par Danielle Charlemagne et Lydie Rappaport. L'anticorps anti-myosine kinase de gésier de dinde, donné par Jean-Claude Cavadore, a été obtenu chez le lapin et purifié par chromatographie sur gel "affi-blue" (Bio-Rad) puis chromatographie d'affinité sur colonne de

calmoduline-sepharose. Il a été vérifié par immuno-transfert que cet anticorps ne réagissait ni avec les protéines myofibrillaires cardiaques, ni avec la calmoduline. L'anticorps anti-myosine V1 de coeur de rat de 3 semaines a été préparé chez le cobaye et purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de myosine-sepharose par Anne-Marie Lompré et Ketty Schwartz. L'anticorps anti-desmine de gésier de dinde a été préparé chez le cobaye par Bénédicte Bertier et est utilisé sans purification.

L'observation microscopique des myocytes a été réalisée en double fluorescence par Jane-Lyse Samuel (Samuel et al. 1983). Les cellules sélectionnées pour l'observation sont celles qui présentent, en microscopie en contraste de phase, un aspect rectangulaire et la striation alternativement claire et foncée caractéristique du myocyte intact (Sommer et Johnson 1979).

2.3.2. Localisation de la myosine kinase et de la calmoduline dans le myocyte isolé

La figure 16 (A et C) montre le marquage par immunofluorescence de la myosine kinase dans un myocyte cardiaque isolé de rat normal. Dans tous les myocytes rectangulaires observés, la fluorescence est répartie de manière homogène dans la cellule, et selon un réseau dont le pas, de l'ordre de 2,1 µm, correspond à la longueur d'un sarcomère. La variation de la mise au point montre que ce marquage présente le même aspect en chaque plan de la cellule. Le marquage des bandes A du filament épais par l'anticorps anti-myosine est représenté figure 16 B. Le réseau de myosine présente le même aspect général que celui de la myosine kinase : la répartition intracellulaire de la fluorescence et le contour des faisceaux de myofibrilles révélé par les bandes longitudinales noires sont identiques dans les deux cas. Le pas du réseau de myosine est également de 2,1 µm. La myosine kinase est donc présente au niveau de chaque sarcomère. Pour préciser sa localisation dans le sarcomère, il est possible de superposer les images A et B (obtenues sur film transparent), à condition de disposer de repères fixes. En effet, en fluorescence, aucune structure cellulaire autre que la protéine marquée n'est apparente. Le seul repère indépendant du marquage est dans ce cas le champ délimité par l'optique du microscope et l'appareil photographique. Le quadrillage millimétré des figures, aligné sur les bords de l'image du négatif projetée sur

l'agrandisseur, définit donc un repère orthonormé qui permet la localisation d'un point de l'image avec une erreur inférieure au micromètre. Dans ces conditions, il est possible d'affirmer que la bande de myosine kinase est localisée à peu près au milieu de la bande de myosine. La figure 16 montre le double marquage de la myosine kinase (C) et de la desmine (D), cette dernière protéine étant un marqueur de la strie Z du sarcomère. La même technique de superposition des deux images montre que les réseaux de myosine kinase et de desmine sont décalés d'un demi-sarcomère, confirmant la position de la myosine kinase sur la bande A du sarcomère.

La figure 17 montre le marquage par immunofluorescence de la calmoduline (A et C) et de la myosine (B). Comme dans le cas de la myosine kinase, la calmoduline définit un réseau régulier, d'un pas de 2,1 µm. Les bandes fluorescentes ont une épaisseur comparable à celles de la myosine kinase et très inférieure à celles de la myosine. La comparaison avec le marquage de la myosine et de la desmine (D) permet de conclure que la calmoduline est située vers le milieu de la bande de myosine, c'est à dire que sa répartition correspond, à ce grossissement, à celle de la myosine kinase. Des résultats préliminaires ne montrent pas de différence du marquage de la myosine kinase et de la calmoduline dans le myocyte du coeur de rat hypertrophié par sténose aortique.

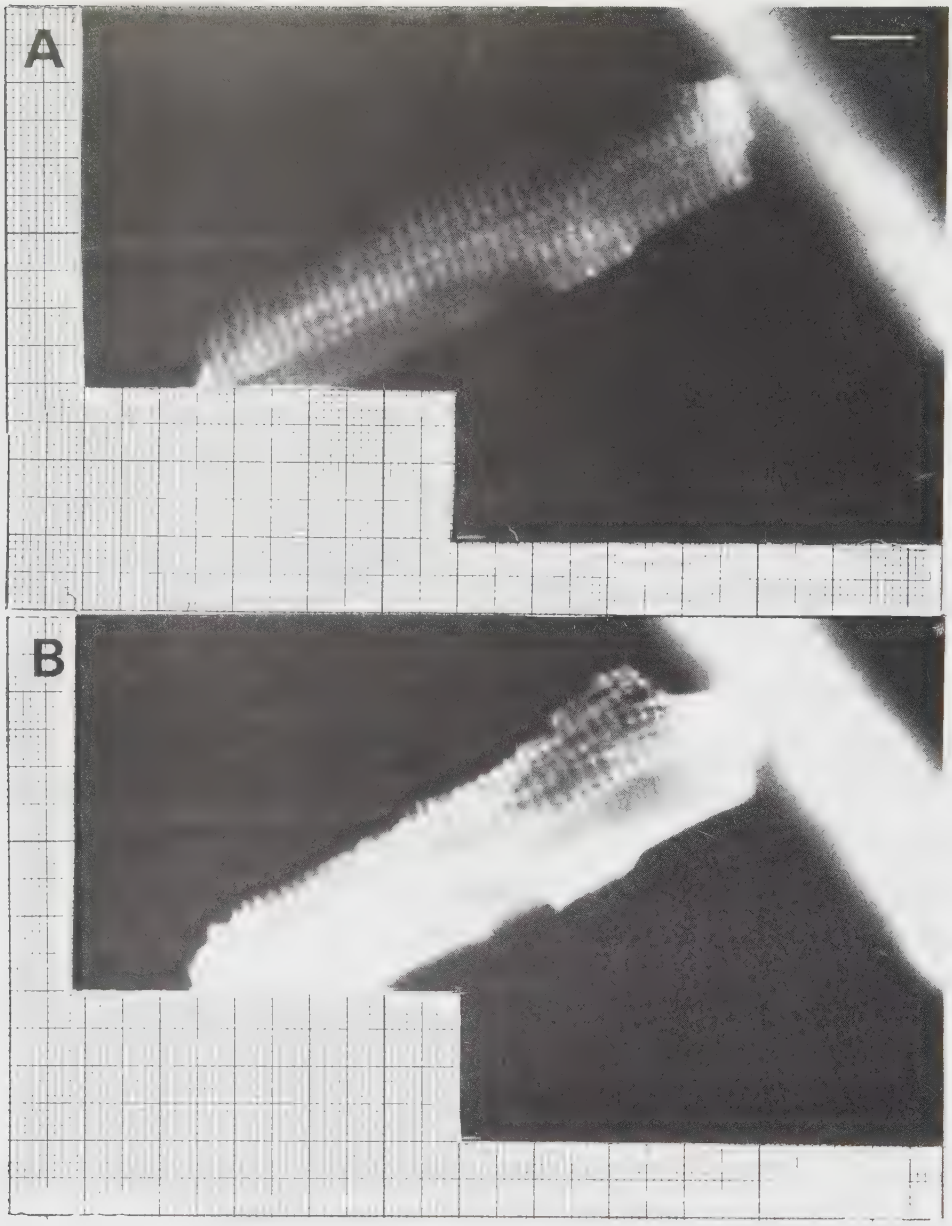
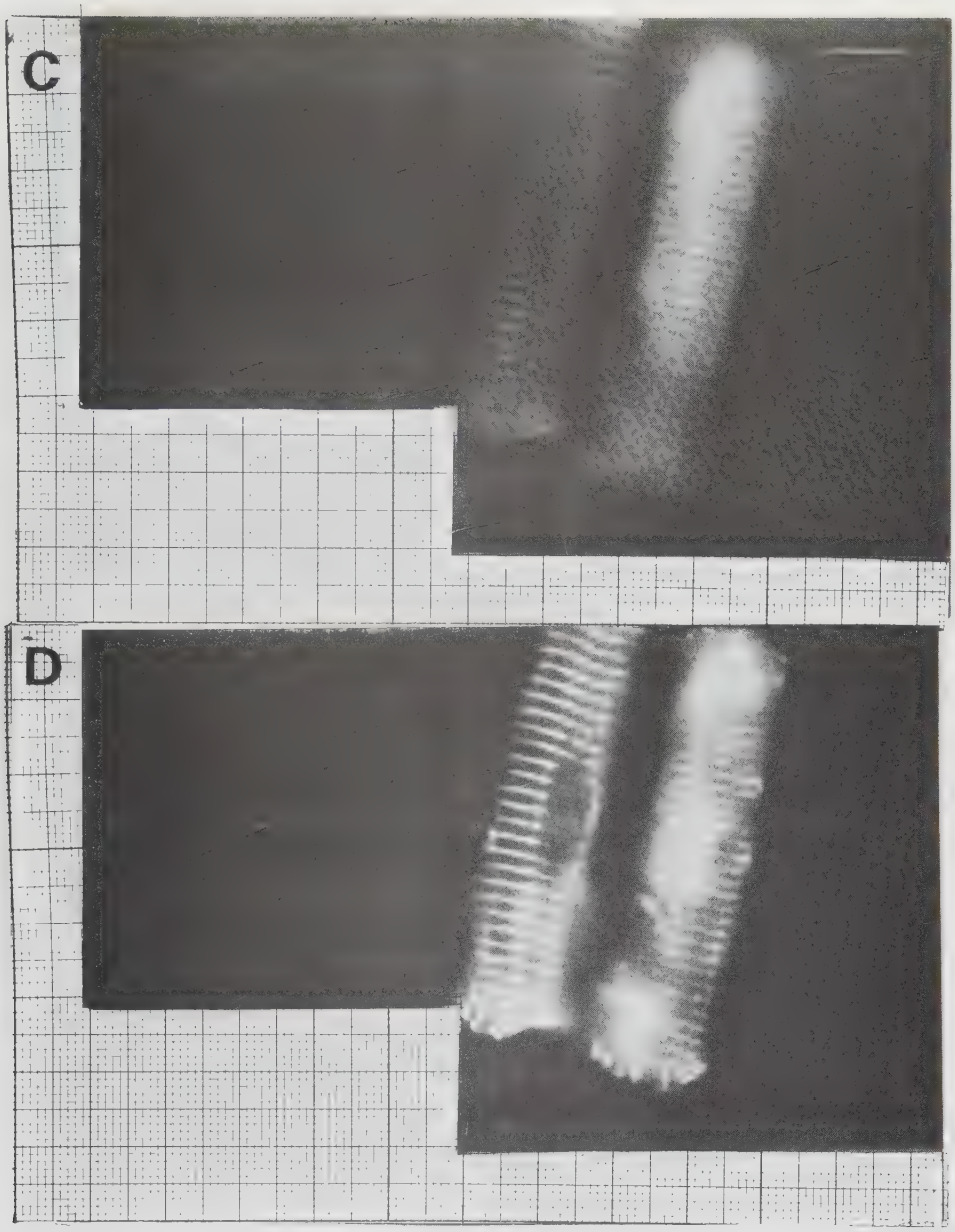


Figure 16 : Photomicrographies du double marquage des protéines par immunofluorescence dans le même myocyte isolé de coeur de rat normal. Les protéines sont la myosine kinase (A) et la myosine de type V1 (B) dans un myocyte et la myosine kinase (C) et la desmine (D) dans un autre myocyte. La barre représente 10 µm. Le quadrillage millimétré, obtenu par superposition photographique, est destiné à fournir un repère fixe par rapport au champ du microscope.


C
D

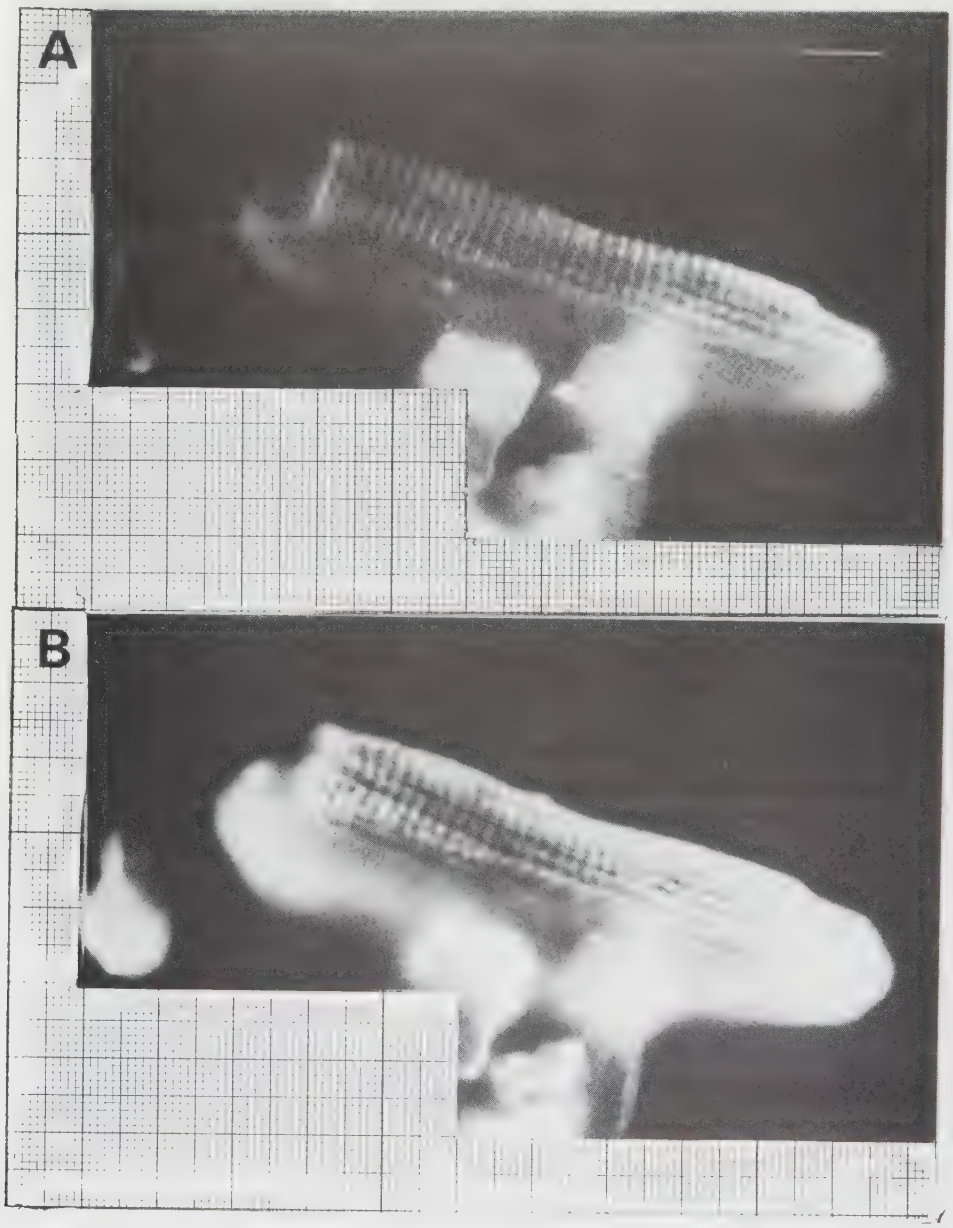
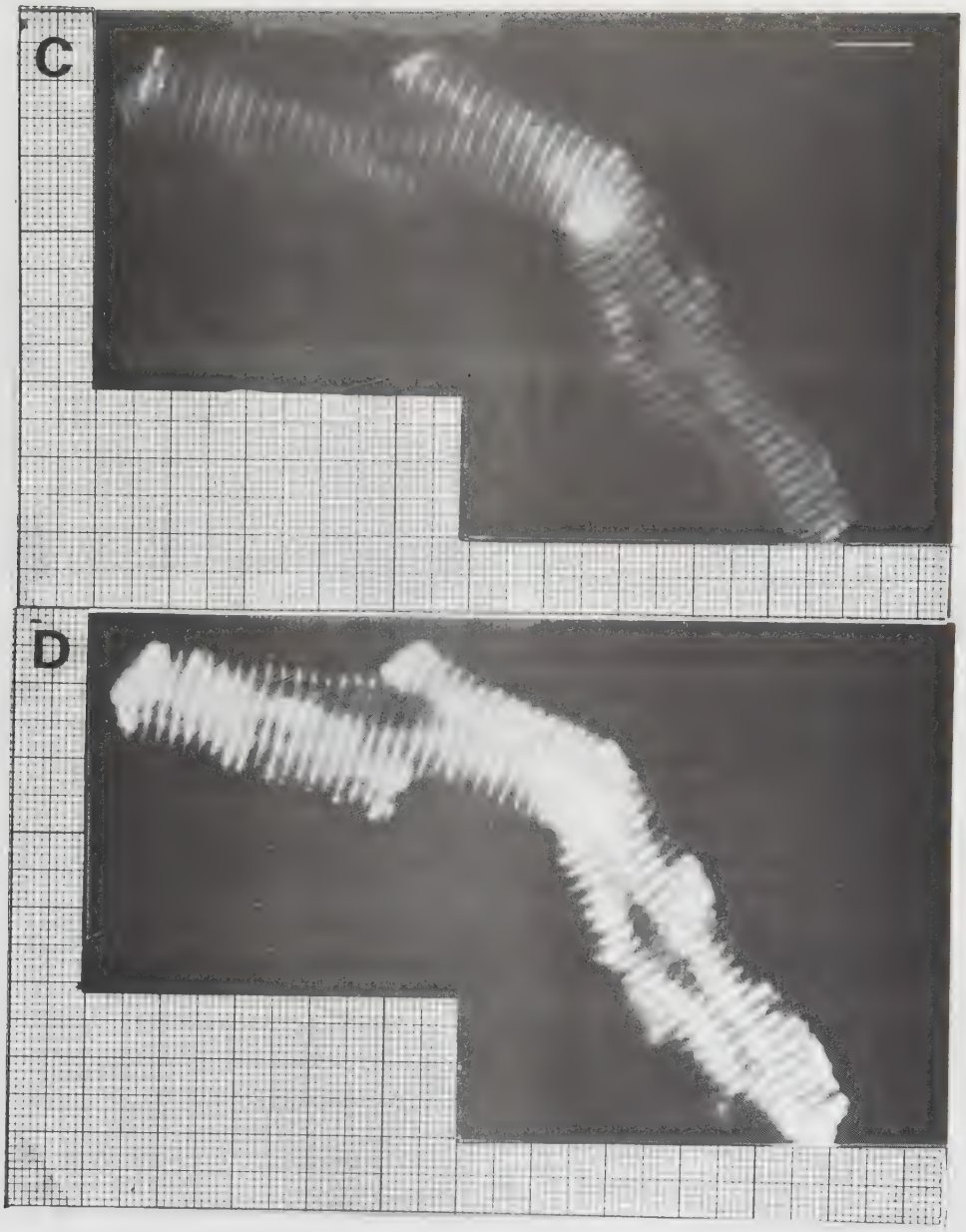


Figure 17 : Même légende que la figure 16, sauf : les protéines sont la calmoduline (A) et la myosine (B) dans un myocyte et la calmoduline (C) et la desmine (D) dans un autre myocyte.


C
D

2.4. Autres activités kinase calmoduline-dépendantes

(Article 5 : Delcayre C, Marotte F, Rappaport L (1983) J Mol Cell Cardiol 15, 61-65).

La calmoduline est le cofacteur de plusieurs kinases cardiaques, dont la myosine kinase, la phosphorylase kinase, et la phospholambane kinase (revue dans : Cohen 1982). D'autres activités kinase activées par le Ca^{2+} et la calmoduline ont été mises en évidence dans des fractions membranaire (Schulmann et Greengard 1978) et soluble cardiaques (Katoh et al. 1981). Une nouvelle activité kinase, qui s'exerce sur un substrat endogène de Mr 43.000, est mise en évidence dans le coeur de rat. Cette activité kinase est révélée par incubation de la fraction soluble cardiaque de rat, purifiée par chromatographie sur résine échangeuse d'ions, en présence de Ca^{2+}, de calmoduline et de ^{32}P-ATP. L'autoradiographie de la fraction incubée montre que le principal substrat phosphorylé est une protéine de Mr 43.000 (article 5, figure 1). La purification de cette fraction, qui contient également la myosine kinase, par chromatographie d'affinité sur colonne de calmoduline-sepharose permet de séparer l'activité enzymatique, liée à la calmoduline, du substrat non retenu sur cette colonne. La phosphorylation de la protéine de Mr 43.000 n'est alors observée que par co-incubation de ces deux fractions (article 5, figure 2). Le substrat phosphorylé a pu être différencié de l'actine et de la troponine T, également phosphorylées dans les conditions employées, mais migrant différemment sur électrophorèse (article 5, figure 2). La figure 18 montre que la phosphorylation de la protéine de Mr 43.000 n'est pas modifiée de manière évidente dans le coeur de rat hypertrophié.

Article 5

Phosphorylation of a 43 kdaltons protein from rat heart by a calmodulin-dependent protein kinase.

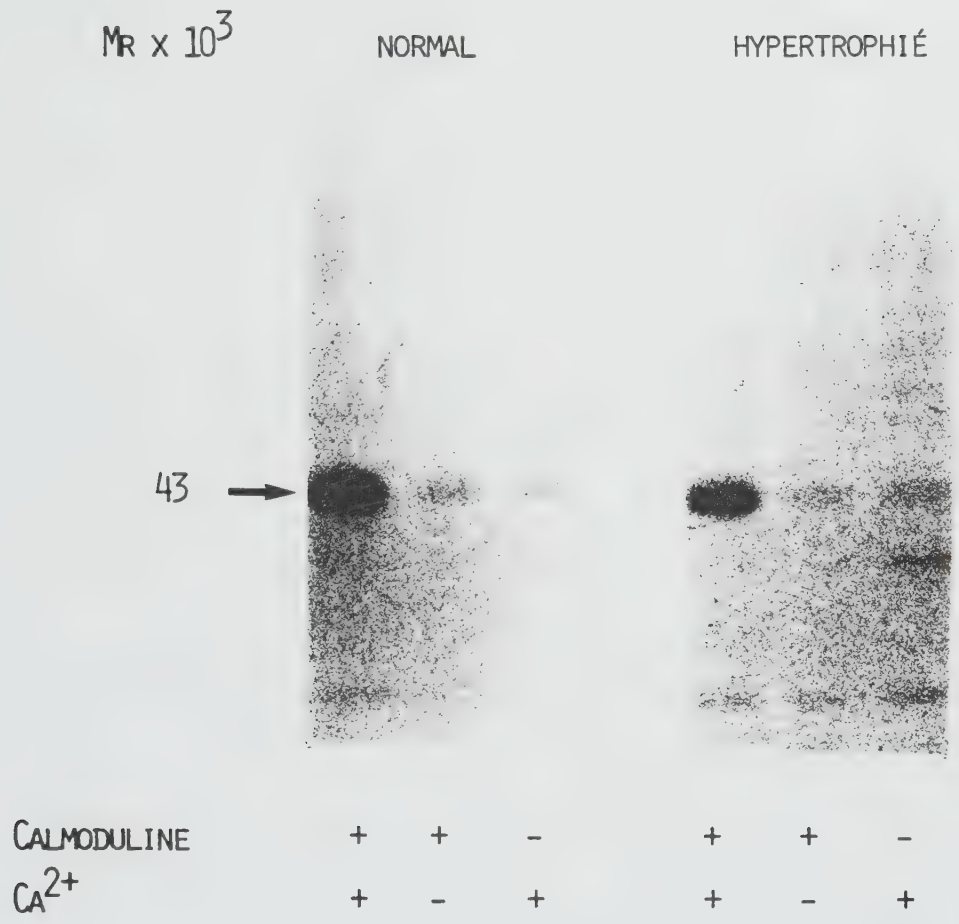


Figure 18 : Autoradiogramme montrant la phosphorylation de la protéine de Mr 43.000 par la kinase Ca^{2+}- et calmoduline-dépendante de coeur de rat, dans le coeur normal et hypertrophié.

Journal of Molecular and Cellular Cardiology (1983) **15**, 61–65

RAPID COMMUNICATION

Phosphorylation of a 43 kdaltons Protein from Rat Heart by a Calmodulin-Dependent Protein Kinase

(*Received* 13 *August* 1982)

The Ca^{2+}-dependent phosphorylation of proteins has been recognized as a major regulatory mechanism of biological processes. In the heart, protein kinases that are activated by Ca^{2+} include phosphorylase kinase, myosin light chain kinase, phospholamban kinase [review in *4*], and the kinases responsible for phosphorylation of endogenous proteins in the membrane [*11*] and soluble [*6*] fractions of the cell. All of these Ca^{2+}-dependent enzymes require the presence, either as an enzyme subunit or as a cofactor, of calmodulin, a Ca^{2+}-binding protein which is involved in various other Ca^{2+}-requiring reactions or processes [review in *3*]. We demonstrate here the presence, in the rat heart, of a soluble calmodulin-dependent protein kinase which seems different from those already described in this tissue. The substrate for this enzyme is a 43 kdaltons protein, present in the same soluble fraction.

All the preparative procedures were carried out at 0 to 4°C unless otherwise stated. Ventricular tissue (total: 10 g) was immediately excised from stunned male Wistar rats (400 g), minced finely with scissors, and homogenized in 3 vol. of 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.25 M sucrose, 4 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM of phenylmethylsulfonylfluoride and benzamidine (buffer A), with 3 passes in a glass-teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at 50 000 × **g** for 45 min and the supernatant was purified by ion exchange chromatography on DEAE-sephacel, with a 0–0.5 M KCl gradient. Calmodulin-activated protein kinase activity exerted on endogenous substrates was assayed by incubating the eluted fraction in the presence of (γ-^{32}P) ATP, 10^{-6} M calmodulin and 0.1 mM Ca^{2+}. The peak of activity, eluted from 40 to 120 mM KCl, was pooled, analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis, and referred to as fraction I. Figure 1 (lane 1) shows that fraction I was heterogenous. Fraction I was incubated in the presence of (γ-^{32}P) ATP, in the different conditions described in the legend to Figure 1, and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. A protein of 43 kdaltons was the main substrate phosphorylated in the presence of calmodulin (Figure 1, lane 2). ^{32}Pi incorporation was quantitated by densitometric scanning of the autoradiogram and approximately 90% of the protein-bound ^{32}Pi was found to be incorporated in that protein. Fraction I was free from endogenous calmodulin, which was eluted from the DEAE-sephacel column at a higher ionic strength. As shown on Figure 1, lane 3, the phosphorylation process was absolutely dependent on the presence of calmodulin in the incubation medium. Incubations were carried out as described in the legend to Figure 1, in the presence of 5.10^{-10} to 1.10^{-6} M calmodulin and the resultant 43 kdaltons phosphorylation level was quantitated by densitometric scanning of the autoradiogram (not shown). The apparent Km for calmodulin of this kinase activity was approximately 5.10^{-8} M. The 43 kdaltons protein phosphorylation, normally observed in the presence of 0.1 mM Ca^{2+} and 10^{-6} M calmodulin, was entirely prevented by either the addition of 2 mM EGTA (Figure 1, lane 4), or of 10^{-4} M trifluoperazine (Theraplix), an inhibitor of the biological effects of calmodulin (not shown). We concluded that a Ca^{2+} and calmodulin-dependent protein kinase which phosphorylates a 43 kdaltons protein was present in fraction I.

We made use of the calmodulin-dependency of this kinase, referred in the text to as "43 K kinase", to purify it further by calmodulin-affinity chromatography. The fraction I was dialyzed against 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM NaCl, 0.2 mM $CaCl_2$, 3 mM Mg acetate, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride and benzamidine (buffer B) and chromatographed on a calmodulin-sepharose 4B column equilibrated in buffer B (Figure 2, A). The fractions were

0022-2828/83/010061 + 05 $03.00/0

© 1983 Academic Press Inc. (London) Limited

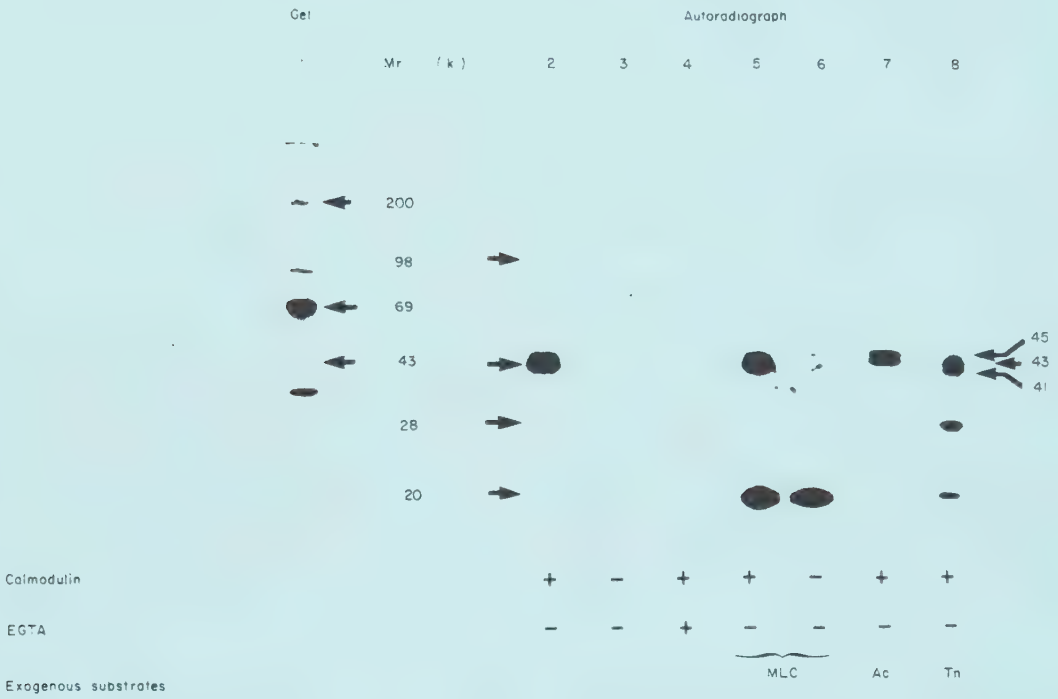


FIGURE 1. Phosphorylation of rat heart proteins under various incubation conditions. The conditions are indicated below the lanes. The fraction I from DEAE-Sephacel chromatography of rat heart homogenate supernatant was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) on a 7–15% acrylamide gel using the buffer system of Laemmli [7]. The proteins were visualized by Coomassie blue coloration (lane 1). The phosphorylation experiments were then carried out by incubation of fraction I (20 µl) in 40 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM dithiothreitol, 10 mM Mg acetate, 0.5 mM (γ-^{32}P) ATP at 80 cpm/pmol 0.1 mM $CaCl_2$, at 30°C for 10 min, in a final volume of 100 µl. 10^{-6} M calmodulin prepared according to [1] was present in incubation medium, unless otherwise indicated. 2 mM ethylene glycol bis (β-amino-ethyl ether) N,N N′,N′ tetraacetic acid (EGTA) was added when indicated. The reaction was stopped either by putting an aliquot onto a Whatman 3 MM filter paper disc which was immersed and washed in 10% trichloroacetic acid and dried for scintillation counting, or by addition of a volume of Laemmli buffer [7] containing 1% SDS and boiling for 2 min for electrophoresis. The phosphorylated substrates were revealed by autoradiography of the dried gel with intensifying screens (lanes 2 to 8). 4 mg ml of isolated beef cardiac myosin light chains (MLC), 0.6 mg/ml of rabbit skeletal muscle actin (Ac) prepared according to [13] or 2 mg ml of rat cardiac troponin (Tn) prepared according to [14] were included to the incubation medium, as indicated (lanes 5 to 8). The molecular weights were determined by comparison with molecular weight markers (Bio-Rad Laboratories), and, are indicated by the arrows (K = kdaltons).

assayed for protein kinase activity and analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described in the legend to Figure 1. Fraction II was not retained on the affinity column. As seen in Figure 2 B, lane 1, the protein pattern of this fraction was quite similar to that of the fraction I (see Figure 1, lane 1). Fraction II contained 99.5% of the proteins loaded on the column. Non-specifically bound proteins were removed by washing the column with buffer B made 0.2 M NaCl (fraction III, Figure 2 A), and then the specifically calmodulin-bound proteins were eluted with buffer B made 0.2 M NaCl and 2 mM EGTA (fraction IV, Figure 2 A). The protein pattern of this fraction is shown in Figure 2 (B), lane 2. The major band of about 65 K daltons represented 72% of the total proteins of fraction IV, as measured by densitometric scanning of the gel. The minor bands observed at about 120 and 35–37 kdaltons represented respectively 7% and 8% of the total proteins of this fraction. Each of the fractions II and IV were incubated in the presence of γ-^{32}P ATP, in the conditions described in the legend to Figure 1, and analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis and autoradiography. Although a minor radioactive band at the level of 43 kdaltons was occasionally evidenced in fraction II (Figure 2 B, lane 3),

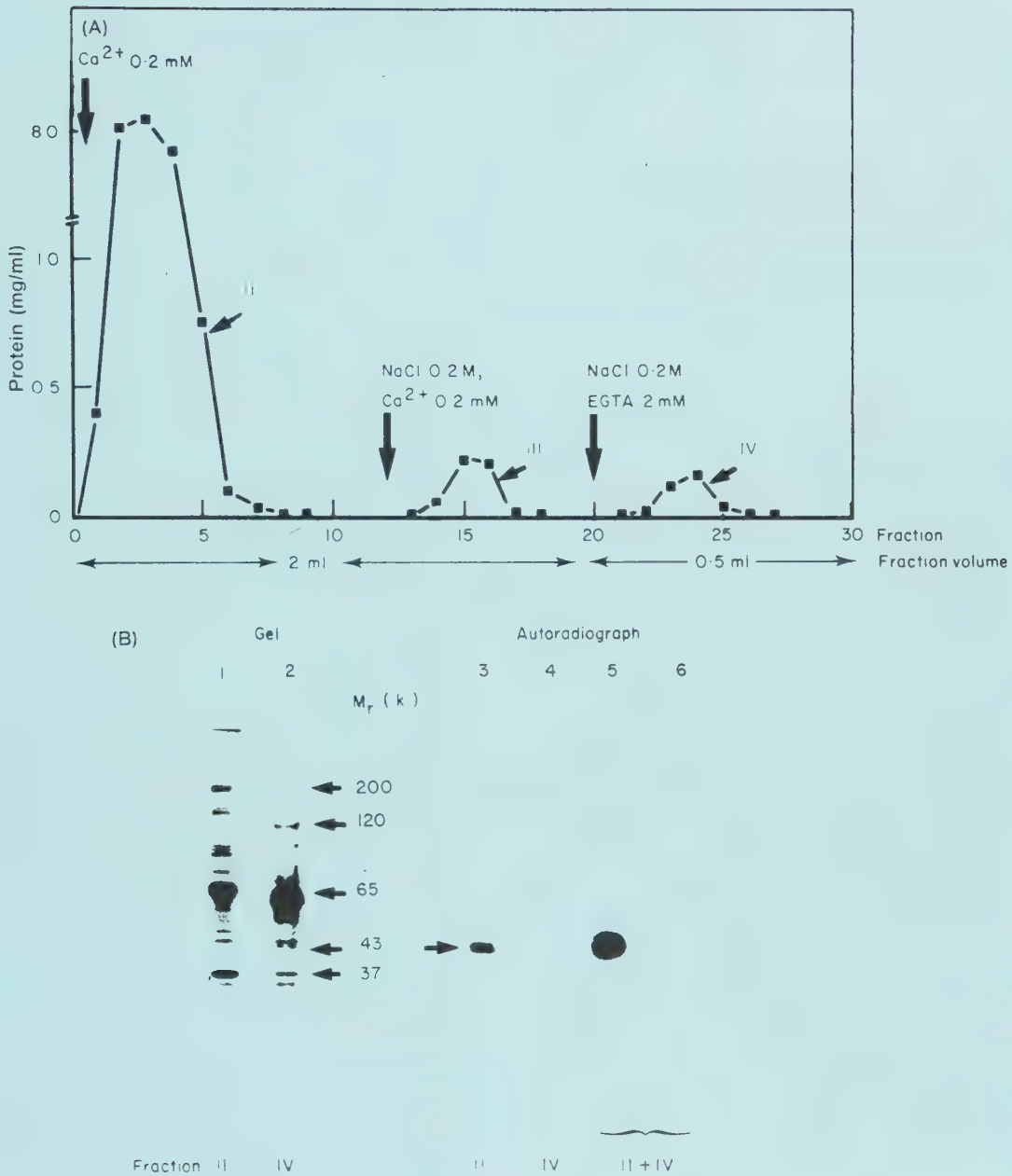


FIGURE 2. Affinity chromatography of the calmodulin-dependent kinase activities from rat heart. (A) The fraction I (see Figure 1) was purified by chromatography on calmodulin-Sepharose 4B as described in the text. Protein concentrations were determined by the method of Bradford [2]. B) The fraction II and IV eluted from the column were analyzed by electrophoresis as described in the legend to Figure 1, and the proteins were visualized by Coomassie blue (lane 1) or silver nitrate [8] (lane 2) coloration. The total amounts of protein applied to the gel were 30 μg (lane 1) and 0.5 μg (lane 2). The column fractions were also incubated separately or together in the conditions described in the legend to Figure 1, in the presence (lanes 3 to 5) or absence (lane 6) of 10^{-6} M calmodulin

no protein was obviously phosphorylated in both fractions (lanes 3 and 4). However, when fractions II and IV were mixed (vol/vol) and incubated in the same way with (γ-^{32}P) ATP, the 43 kdaltons protein was phosphorylated, when 10^{-6} M calmodulin was also added (Figure 2 (B), lanes 5 and 6). Therefore, the substrate of 43 K kinase, i.e. the 43 K protein had no affinity for calmodulin and was thus not retained by the affinity column, whereas the enzyme could only be eluted from the column with 2 mM EGTA. We have thus demonstrated the presence in fraction IV of a calmodulin-dependent protein kinase able to phosphorylate a 43 kdaltons protein. This fraction contained several proteins, as revealed by the electrophoresis (Figure 2 (B), lane 2). As the purification procedure was that usually used for the purification of most of the calmodulin-binding proteins, we could suppose that fraction IV contains several calmodulin-dependent protein kinases.

These observations raised two questions: (i) could the 43 K kinase be identified with a calmodulin-dependent protein kinase already described in the literature? (ii) what is the nature of the 43 kdaltons protein? In order to answer the first question, we compared the biochemical properties of two well described soluble calmodulin-activated protein kinases, i.e. myosin light chain kinase and phosphorylase kinase, with the properties that we observed for the 43 K kinase. The myosin light chain kinase was evidenced in fractions I and IV by the phosphorylation of added bovine cardiac myosin light chains. In fraction IV, this activity was Ca^{2+} and calmodulin-dependent (not shown). Myosin light chain kinase has been purified by different laboratories and it has a molecular weight of 85 or 95 kdaltons in bovine heart [review in *15*] and 65 kdaltons in dog heart [*10*]. This enzyme could thus be the major protein of 65 K present in fraction IV. We observed that, in fraction I (Figure 1, lanes 5 and 6), the characteristics of phosphorylation of both 43 kdaltons protein and myosin light chains clearly differed: around 50% of the myosin light chain phosphorylating activity was calmodulin-independent, while, in the same assay, the 43 kdaltons protein phosphorylating activity was entirely calmodulin-dependent. Loss of calmodulin-dependency is the result of a partial proteolysis of the myosin light chain kinase [*15*]. It is unlikely that the sensitivity of myosin light chain kinase to proteolysis would differ depending on the substrate. On the other hand, myosin light chain kinase has been until now recognized as highly specific for myosin light chains [*15*]. For these reasons, myosin light chain kinase does not seem to be responsible for the phosphorylation of the 43 kdaltons protein. Phosphorylase kinase has been described by Cohen *et al.* [*5*] as a calmodulin-activated enzyme. However, it is very unlikely that it might be responsible for phosphorylation of the 43 K protein, as: (i) cardiac isoenzyme of phosphorylase kinase is not inhibited by trifluoperazine [*9*] and (ii) it does not bind to a calmodulin-sepharose column in our conditions, i.e. 0.2 mM Ca^{2+} [*12*], and indeed the phosphorylase kinase subunits α' and β (135 and 128 kdaltons respectively) were not evidenced in the electrophoregram of fraction IV (Figure 2 (B), lane 2). Katoh *et al.* [*6*] described in the guinea-pig heart, a mitochondrial protein of 44 kdaltons, the phosphorylation of which is partially inhibited in the absence of calmodulin. With the aim to avoid lysis of subcellular organelles, and thus contamination of the soluble fraction by membranes or mitochondrial components, we used an isotonic extraction buffer (buffer A). We observed no change in our 43 K kinase activity when extraction was carried out in hypotonic conditions (buffer A without sucrose), and after centrifugation of the homogenate so obtained at 200 000 × **g** for 30 min (not shown). Thus, the 43 K kinase activity seems to be of cytoplasmic origin, and could not be related to an already known activity.

Concerning the nature of the 43 kdaltons protein, various possible substrates for the 43 K kinase, having molecular weights around 43 K, were tested by incubation with fraction I. Figure 1 (lanes 7 and 8) shows that skeletal muscle actin (45 kdaltons in our electrophoresis system), and rat cardiac troponin T (41 kdaltons) were phosphorylated but did not comigrate with the unknown 43 kdaltons phosphorylated protein. Bovine heart creatine kinase (40 kdaltons) (Sigma Chemical Co.) was not phosphorylated. It appears that the 43 K kinase substrate is neither actin, troponin T, nor creatine kinase.

In conclusion, we show here the existence of a new calmodulin-dependent phosphorylating system in rat heart. Together with the works of Katoh *et al.* [*6*] and Schulman *et al.* [*11*] who observed other substrate-kinase pairs in guinea-pig and rat heart, our data provide additional evidence supporting a mediating role for calmodulin in heart muscle. Further purification and characterization of the 43 kdaltons protein should lead to a better understanding of its involvement in regulation of myocardial function.

ARTICLE 5

Acknowledgements

The authors would like to express their thanks to Drs K. Schwartz and B. Swynghedauw for helpful discussions, Dr P. S. Cassidy for reading the manuscript and M. Albaret and P. Cagnac for secretarial assistance. They also thank P. Bouveret from the laboratory for providing actin. Trifluoperazine was a gift of Theraplix laboratories, Paris, France.

Claude Delcayre, Françoise Marotte and Lydie Rappaport

INSERM Unité 127, *Hôpital Lariboisière*,
41, *bld de la Chapelle*, *F*-75010 *Paris*, *France*

KEY WORDS: Calmodulin dependent kinases; Phosphorylation; Heart phosphorylated proteins.

REFERENCES

1. AUTRIC, F., FERRAZ, C., KILHOFFER, M. C., CAVADORE, J. C. & DEMAILLE, J. G. Large scale purification and characterization of calmodulin from ram testis. Biochim Biophys Acta **631**, 139–147 (1980).
2. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **721**, 248–254 (1976).
3. CHEUNG, W. Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. Science **207**, 19–27 (1980).
4. COHEN, P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. Nature **296**, 613–620 (1982).
5. COHEN, P., PICTON, C. & KLEE, C. B. Activation of phosphorylase kinase from rabbit skeletal muscle by calmodulin and troponin. FEBS Lett **104**, 25–30 (1979).
6. KATOH, N., WRENN, R. N., WISE, B. C., SHOJI, M. & KUO, J. F. Substrate proteins for calmodulin-sensitive and phospholipid sensitive Ca^{2+}-dependent protein kinases in heart, and inhibition of their phosphorylation by palmitoyl carnitine. Proc Natl Acad Sci USA **78**, 4813–4817 (1981).
7. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680–685 (1970).
8. MERRILL, C. R., GOLDMAN, D., SEAMAN, S. A. & EBERT, M. H. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science **211**, 1437–1438 (1981).
9. PICTON, C., KLEE, C. B. & COHEN, P. The regulation of muscle phosphorylase kinase by calcium ions, calmodulin and troponin-C. Cell Calc **2**, 281–294 (1981).
10. RAPPAPORT, L. & ADELSTEIN, R. S. Phosphorylation of canine cardiac muscle myosin light chain kinase. Abstract. Fed Proc **39**, 2041 (1980).
11. SCHULMAN, H. & GREENGARD, P. Ca^{2+}-dependent protein phosphorylation system in membranes from various tissues, and its activation by "calcium-dependent regulator". Proc Natl Acad Sci USA **75**, 5432–5436 (1978).
12. SHARMA, R. K., TAM, S. W., WAISMAN, D. M. & WANG, J. H. Differential interaction of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase isozymes with calmodulin. J Biol Chem **255**, 11102–11105 (1980).
13. SPUDICH, J. A. & WATT, S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. J Biol Chem **246**, 4866–4871 (1971).
14. TSUKUI, R. & EBASHI, S. Cardiac troponin. J Biochem (Tokyo) **73**, 1119–1121 (1973).
15. WALSH, M. P. Calmodulin-dependent myosin light-chain kinases. Cell Calc **2**, 333–352 (1981).

D. DISCUSSION

Les premières études concernant la myosine suggéraient l'existence de trois types de myosine dans les muscles striés :

- la myosine de muscle squelettique (type : muscle blanc de lapin), à activité ATPase forte.
- la myosine de muscle squelettique (type : muscle rouge pur, comme le soleus de cobaye), à activité ATPase plus faible.
- la myosine cardiaque, à activité encore plus faible.

Si l'on peut toujours définir des caractères spécifiques aux myosines squelettique et cardiaque, on sait maintenant que ces caractères ne sont pas l'expression d'une population moléculaire homogène. Les mesures comparatives de Bendall (1964) et Barany (1967), effectuées sur des muscles squelettiques de différentes espèces, ont montré que cette classification simple devait être nuancée. Les résultats décrits dans les articles 1 et 2 établissent que l'ATPase de la myosine du myocarde ventriculaire ou auriculaire varie en fonction de la taille de l'espèce. Les résultats de Syrovy et Gutman (1975) qui établissent une relation inverse entre Ca^{2+}-ATPase de la myosine cardiaque et taille de l'animal sont en accord avec cette conclusion. Il n'existe donc pas une, mais des myosines cardiaques. Cette observation a été confirmée par Schwartz et al. (1977) qui observent une spécificité immunologique d'espèce de la myosine cardiaque, puis, ultérieurement, par la découverte d'isoformes de la myosine cardiaque distribuées différemment selon l'espèce (discuté plus loin).

1. RELATION ENTRE LA Ca^{2+}- ATPase ET LA CONTRACTILITE

On peut s'interroger sur la raison de cette variation d'activité enzymatique.

L'article 1 établit une relation entre la Ca^{2+}-ATPase de la myosine cardiaque et la Vmax du myocarde, i.e. un paramètre rendant compte de ses propriétés mécaniques (voir figure 9). Ce résultat signifie que l'un des déterminants majeurs de la contractilité cardiaque est la vitesse maximale à laquelle la myosine peut hydrolyser l'ATP et interagir avec l'actine (bien que l'équivalence entre hydrolyse d'un ATP et dislocation d'un pont actine-myosine ne soit pas encore établie). Il a toutefois été

observé des variations de Vmax en fonction de la concentration calcique dont le mécanisme est actuellement inexpliqué (revue dans Alpert et al. 1979).

Van Thiem et al. (1978) ont montré que la libération initiale de phosphate mesurée sur la myosine cardiaque de plusieurs espèces est corrélée significativement avec l'ATPase mesurée en état stationnaire (figure 19), et donc avec la Vmax. On peut assimiler la libération initiale du phosphate au déclenchement effectif de la contraction, ces deux événements se déroulant sur la même échelle de temps (Van Thiem et al. 1978). La corrélation entre la vitesse de libération initiale du phosphate et la Vmax s'interprète donc bien.

L'interdépendance de l'ATPase de la myosine et de la contractilité démontrée ici peut également être vérifiée en comparant les oreillettes et les ventricules : l'activité myosine ATPase supérieure dans les oreillettes de plusieurs espèces (article 2) correspond à une Vmax environ 4 fois plus élevée dans l'oreillette que dans le ventricule chez le chien (Urthaler et al. 1975). Ces auteurs remarquent que les deux types de muscle développent la même tension totale, mais en un temps beaucoup plus court dans le cas de l'oreillette. Le ventricule, à Vmax plus faible, se caractérise donc par une montée en pression plus lente. Cette remarque peut être étendue aux ventricules de différentes espèces animales. Il est connu que la fréquence cardiaque varie en fonction inverse du poids corporel ou cardiaque (Clark 1927, Grande et Taylor 1965). Etant donné que la pression systolique varie peu d'une espèce à l'autre, puisque c'est une grandeur sans dimension, et que le pourcentage du cycle cardiaque représenté par le temps d'éjection systolique varie également peu en fonction de l'espèce (Clark 1927), il est attendu que la montée en pression se fasse plus rapidement chez les espèces ayant une fréquence cardiaque plus élevée. La vitesse d'augmentation de la pression auriculaire (dP/dt) est un des index - imparfaits - de la contractilité cardiaque (discuté dans Brutsaert et Sonnenblick 1974), et l'observation d'une corrélation entre Vmax et fréquence cardiaques (Henderson et al. 1970) est satisfaisante.

Les hormones peuvent modifier la contractilité cardiaque, temporairement comme les catécholamines (Revue dans Stull et Mayer 1979) ou de manière prolongée comme la thyroxine (revue dans Freedberg et

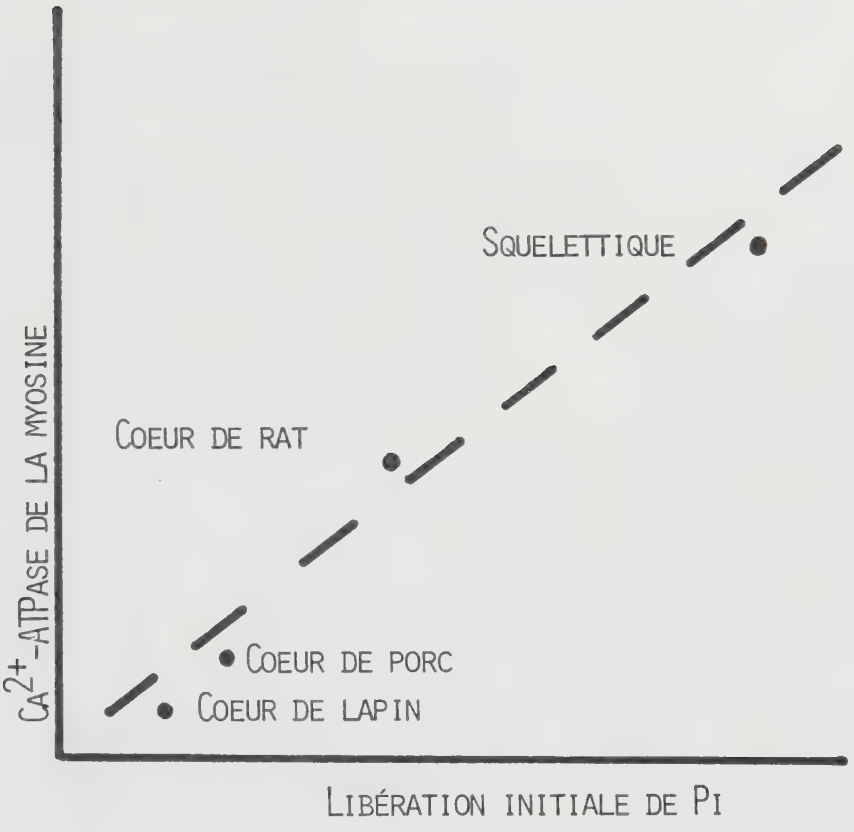


Figure 19 : Relation entre la libération initiale de phosphate et l'ATPase mesurée à l'état stationnaire chez différentes espèces (d'après Van Thiem et al. 1978).

Hamolsky 1974). Si la myosine est effectivement le déterminant biochimique de la vitesse de contraction, on peut supposer qu'elle varie dans ces conditions. Effectivement, à une augmentation de la contractilité cardiaque induite par la thyroxine (Buccino et al. 1967, Goodkind et al. 1974, Gunning et al. 1974 , Pannier 1968, Skelton et al. 1973, Strauer et Scherpe 1975), on peut associer une augmentation de l'activité Ca^{2+}-ATPase de la myosine cardiaque (Alpert et Mulieri 1981, Delcayre et Swynghedauw 1979, Goodkind et al. 1974, Thyrum et al. 1970, Yazaki et Raben 1975) chez le chien, le lapin, le cobaye, mais pas le rat (Yazaki et Raben 1975). Goodkind et al. (1974) ont montré que ces deux paramètres étaient corrélés au cours du traitement par la thyroxine chez le cobaye.

L'augmentation de contractilité et d'activité enzymatique de la myosine n'apparaissent qu'après un délai de une à deux semaines, ce qui permet de soutenir l'hypothèse de la stimulation, par la thyroxine, de la synthèse d'une myosine cardiaque différente de la myosine normale. La corrélation de l'activité ATPase de la myosine cardiaque avec l'incorporation de ^{3}H-lysine dans cette molécule (article 3) est un bon argument en faveur de cette hypothèse, confirmée depuis (discuté plus loin).

L'influence de l'activité physique sur les propriétés enzymatiques de la myosine est mise en évidence par la comparaison du lapin et du lièvre, deux espèces de taille similaire (article 2). Il est connu que le coeur du lièvre est beaucoup plus gros que celui du lapin domestique (Grande et Taylor 1965), mais sa contractilité n'a pas été mesurée. On peut avancer l'hypothèse qu'elle est supérieure à celle du lapin, dans le rapport des activités enzymatiques de leurs myosines cardiaques. L'imposition d'un exercice physique important (natation, course) entraîne chez le rat une augmentation de l'activité Ca^{2+}-ATPase de la myosine cardiaque (Bhan et Scheuer 1972, 1975, Malhotra et al. 1981, Medugorac 1975, Penpargkul et al. 1980, Resink et al. 1981, Wilkerson et Evonuk 1971) et une hypertrophie cardiaque, dite physiologique (coeur du sportif). Il a été montré, dans le même modèle, que la contractilité cardiaque était augmentée (Bersohn et Scheuer 1977, Schaible et Scheuer 1979).

2. SIGNIFICATION DES VARIATIONS DE LA MYOSINE ATPase

2.1. Variations physiologiques et pathologiques

Des variations d'activité ATPase de la myosine sont également observées dans d'autres situations physiopathologiques.

En 1962, Alpert et Gordon observent une chute de l'ATPase myofibrillaire dans le coeur humain défaillant. Le modèle expérimental de la surcharge mécanique cardiaque, étudié au laboratoire, qui reproduit une situation observée en pathologie humaine, permet d'imposer de manière permanente un surcroît de travail au coeur (revue dans l'article 6).

Le tableau V résume les modifications de l'activité Ca^{2+}-ATPase de la myosine cardiaque observées dans diverses situations physiologiques et sous l'influence de la thyroxine. L'ensemble des résultats présentés dans ce tableau permet de conclure que la Ca^{2+}-ATPase de la myosine est 1/ adaptée aux propriétés contractiles du muscle considéré, et 2/ susceptible de variation - avec délai - lorsque les propriétés contractiles varient. En accord avec ces résultats, les observations effectuées après surcharge chronique de pression montrent qu'il existe une diminution parallèle de la Ca^{2+}-ATPase de la myosine et de la contractilité du myocarde (Alpert et al. 1974, Berson et Swynghedauw 1973, Cooper et al. 1973, 1981, Coulson et al. 1977, Hamrell et Alpert 1977, Katagiri et Morkin 1974, Lompré et al. 1979, Luchi et al. 1969, Maugham et al. 1979, Mayr et al. 1980, Schwartz et al. 1978, Shiverick et al. 1976, Skelton et Sonnenblick 1974, Spann et al. 1967, Swynghedauw et al. 1973; revue dans : Lompré 1982 et article 6).

Les résultats de l'article 2 montrent que la K^{+}-EDTA ATPase de la myosine ne varie pas ou très peu en fonction de la contractilité cardiaque. Cette observation est en accord avec celles publiées par d'autres auteurs (Hamrell et Low 1978, Higuchi et al. 1978, Syrovy 1982, Yazaki et Raben 1974, Yazaki et al. 1979).

Ces remarques conduisent à se poser les questions suivantes : 1/ pourquoi la Ca^{2+}-ATPase de la myosine varie-t-elle dans les conditions décrites plus haut et quel est le signal qui va déclencher cette variation ? et 2/ comment expliquer en termes biochimiques une telle possibilité de variation de l'activité enzymatique ? A ces questions, il est possible de répondre en partie :

TABLEAU V VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE LA Ca^{2+}-ATPase DE LA MYOSINE

AUTEUR	ANNEE	ESPECE(S)	ATPase	CORRELATION AVEC CONTRACTILITE
A/ EN FONCTION DE L'ESPECE				
1/ COEUR				
KRITCHER et al.	70	chien, homme	ATPase chien 1,5 fois > homme	
YAZAKI et RABEN	74	souris, rat, lapin, chien	ATPase souris et rat 3 fois > lapin et chien	
SYROVY et GUTMAN	75	souris, rat, cobaye, lapin, chat, chien	relation ATPase avec 1/taille de l'animal	
DELCAYRE et SWYNGHEDAUW	75	rat, cobaye, lapin, chien	relation ATPase - Vmax	oui
SYROVY	75	souris, rat, cobaye, lapin, porc (lapin : nouveau-né et adulte)	sensibilité ATPase à pH 10 faible si ATPase élevée relation ATPase avec 1/taille de l'animal	
SCHWARTZ et al.	77	rat, porc	relation ATPase avec structure de la chaîne lourde	
HIGUCHI et al.	78	rat, cobaye, lapin, chat, chien, mouton, homme	relation ATPase avec 1/taille de l'animal	
HAMRELL et LOW	78	lapin, marmotte	relation ATPase-Vmax en fonction de la température	oui
VAN THIEM et al.	78	rat, lapin, porc	relation jet initial Pi-Vmax	
SYROVY et al.	79	rat, lapin, lièvre, chat, porc, vache	relation ATPase avec 1/taille de l'animal domestique; ATPase lièvre > lapin	
YAZAKI et al.	79	rat, souris, lapin, chien, homme	relation ATPase avec 1/taille	
LOMPRE et al.	81	souris, rat, lapin, porc	relation ATPase avec type de l'isomyosine	
SYROVY	82	souris, rat, lapin, vache	relation ATPase avec 1/taille de l'animal	

2/ MUSCLE SQUELETTIQUE

BENDALL	64	rat, lapin, porc,) dos et boeuf, mouton) pattes	ATPase rat et lapin ≫ aux autres (myofibrilles)	
BARANY	67	espèces et muscles variés	corrélation ATPase-Vmax	oui
SYROVY et GUTMAN	75	souris, rat, cobaye) soleus, chat, lapin, chien) EDL	relation ATPase avec 1/taille de l'animal	

B/ EN FONCTION DU TYPE DE MUSCLE

1/ COEUR/MUSCLE SQUELETTIQUE RAPIDE

BRAHMS et KAY	63	chien	ATPase muscle squelettique > coeur	
BARANY et al.	64	lapin	- d° - 3 fois > - d° -	
LUCHI et al.	65	chien	- d° - 1,5 fois > - d° -	
KATZ et al.	66	coeur : chien muscle : lapin	- d° - 3 fois > - d° -	
SWYNGHEDAUW et BOUVERET	70	lapin	- d° - 2 fois > -d° - (actomyosine)	
SWYNGHEDAUW	74	lapin	- d° - 2,5 fois > - d° -	
KLOTZ et al.	75	coeur : porc, homme muscle : lapin	- d° - 3 fois > - d° -	
DELCAYRE et SWYNGHEDAUW	75	lapin	- d° - 6 fois > - d° -	

2/ OREILLETTES / VENTRICULES

KLEID et al.	72	rat	ATPase oreillettes et ventricules identiques
YAZAKI et al.	77	chien, homme	ATPase oreillettes > ventricules
LONG et al.	77	chien	- d° -
FLINK et al.	78	veau	- d° -
SYROVY et al.	79	lièvre, chien, porc, vache	ATPase oreillettes 1,5 fois > ventricules
YAZAKI et al.	79	souris, rat, lapin, chien, homme	ATPase oreillettes 2-3 fois > ventricules

3/ VENTRICULE GAUCHE / VENTRICULE DROIT

SMITH et al.	74	chien	ATPase VG 1,3 fois > VD
WIKMAN-COFFELT et al.	75	chien	- d° -
SYROVY et al.	79	rat, lapin, lièvre, chat, chien, porc, vache	pas de différence entre VG et VD

C/ INFLUENCE DE LA THYROXINE (T_4)

AUTEUR	ANNEE	ESPECE/TRAITEMENT (1 u. = 1 mg T_4/kg)	Ca^{2+}-ATPase	Contractilité (m.p. = muscle papillaire)
BUCCINO et al.	67	chat (1u/j; 14 j)		m.p. : ↗ Vmax; Po =
BUCCINO et al.	68	- d° -		m.p. : ↗ Vmax 86% (thyroidectomie : /Vmax 36%)
PANNIER	68	chat (1u/j; 10 j.)		↗ Vmax et dP/dt (100%) ↗ Po (200%)
HJALMARSON et al.	70	rat hypophysectomisé	↙ 47% normalisé par T_4	↙ dP/dt normalisé par T_4
TAICHMAN et KORECKY	70	- d° -		↙ dP/dt (100%) normalisé par T_4
THYRUM et al.	70	cobaye (0,25 u/j; 8j.)	↗ 31% (variation hélicité et % 4 acides amines de la myosine)	
THYRUM et al.	71	cobaye (0,25 u/j; 8j.)	↗ 33%	↗ dT/dt; ↙ t systole et t pic de tension (décelables dès le 1er jour)
ROVETTO et al.	72	rat hypophysectomisé	↙ 30% normalisée par T_4	↙ P systolique 15% normalisée par T_4
SKELTON et al.	73	coeur isolé de chien) m.p. isolé de rat) + T_4		à 45 mn) aucune variation) dT/dt, Po, à 8 h) t pic de tension
GOODKIND et al.	74	cobaye (0,25 u/ j; 1-3 s.)	↗ 30%	m.p. : ↗ corrélée DT/dt

GUNNING et al.	74	chat (0,25 u/j; 15 j.)		m.p. : ↗ Vmax, dT/dt et Po
STRAUER et SCHERPE	75	chat (1 u/j; 8-18 j.)		↗ dT/dt et V vontraction isotonique
YAZAKI et RABEN	75	rat	inchangée (↙ % si thyroidectomie)	
		lapin	↗ 200% (inchangée si thyroidectomie)	
BANERJEE et al.	76	lapin (0,2 u/j; 15 j.)	↗ 150%	
CONWAY et al.	76	chien (extrait thyroidien; 2 - 6 mois)	↗ 20%	↗ débit cardiaque 150-300 %
SKELTON et al.	76	lapin (0,25 u/j; 10 j.)		↗ dT/dt 80%; ↙ t pic de tension 20%
BANERJEE et MORKIN	77	lapin (0,2 u/j; 15j.)	↗ ATPase actine activée ↙ Kapp (actine)	
LITTEN et al.	81	lapin (0,2 u/j; 14 j.)	↗ 100% ATPase myofibrillaire phosphorylation LC_2 et Tn I inchangées	

2.2. Relation entre Ca^{2+}- ATPase de la myosine et rendement énergétique

Chaque muscle se contracte à une vitesse déterminée, qui correspond à sa fonction physiologique. Goldspink (1975) a fait, sur le muscle squelettique, l'observation qui est illustrée figure 20. En faisant varier la charge imposée à un muscle lent et à un muscle rapide, il constate que le rendement énergétique (c'est-à-dire le rapport de l'énergie mécanique fournie à l'énergie consommée) de chaque muscle est maximal pour une vitesse de raccourcissement qui correspond à la vitesse de raccourcissement de ces muscles. C'est-à-dire que chaque muscle se contracte in vivo à la vitesse qui correspond à la meilleure utilisation possible de l'énergie. Nwoye et Goldspink (1981) établissent une relation de pente négative entre le rendement énergétique et la contractilité (Vmax) du muscle squelettique (figure 21). La raison de cette baisse de rendement à vitesse élevée pourrait, d'après ces auteurs, être due à la moindre durée des interactions actine-myosine pour la même quantité d'ATP consommé. On peut en conclure, en faisant la synthèse de ces résultats et de ceux de Barany (1967), que plus la Vmax - donc la myosine ATPase - est faible, plus le rendement énergétique du muscle est élevé.
Ces caractéristiques du muscle squelettique strié sont très vraisemblablement applicables au muscle cardiaque, dont le mécanisme contractile est identique dans son principe. Alpert et Mulieri (1982) ont mesuré l'énergie dissipée sous forme de chaleur associée au mouvement des myofilaments dans le coeur de lapin normal, soumis à une surcharge de pression, et thyrotoxique. A une myosine ATPase inférieure à la normale (surcharge de pression) correspond une augmentation du rendement énergétique, et, inversement, l'augmentation de la myosine ATPase induite par la thyroxine est associée à une baisse du rendement énergétique de la fibre cardiaque. Les observations réalisées en physiologie et en pathologie sont concordantes. Il semble donc que la valeur de la myosine ATPase d'un muscle soit définie par le meilleur rendement énergétique pour sa vitesse de raccourcissement physiologique.

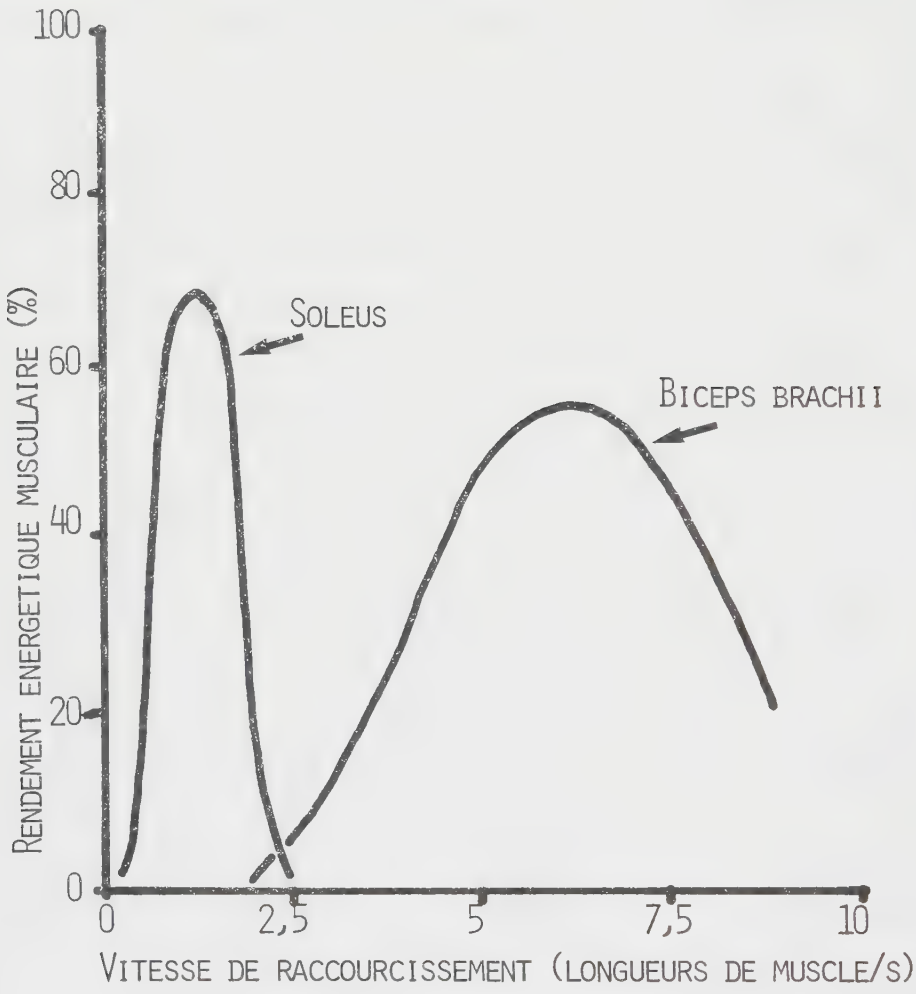


Figure 20 : Relation entre le rendement énergétique et la vitesse de raccourcissement pour le muscle squelettique en contraction isotonique. Les différentes vitesses de raccourcissement sont obtenues pour chaque muscle par variation de la charge imposée (d'après Goldspink 1975).

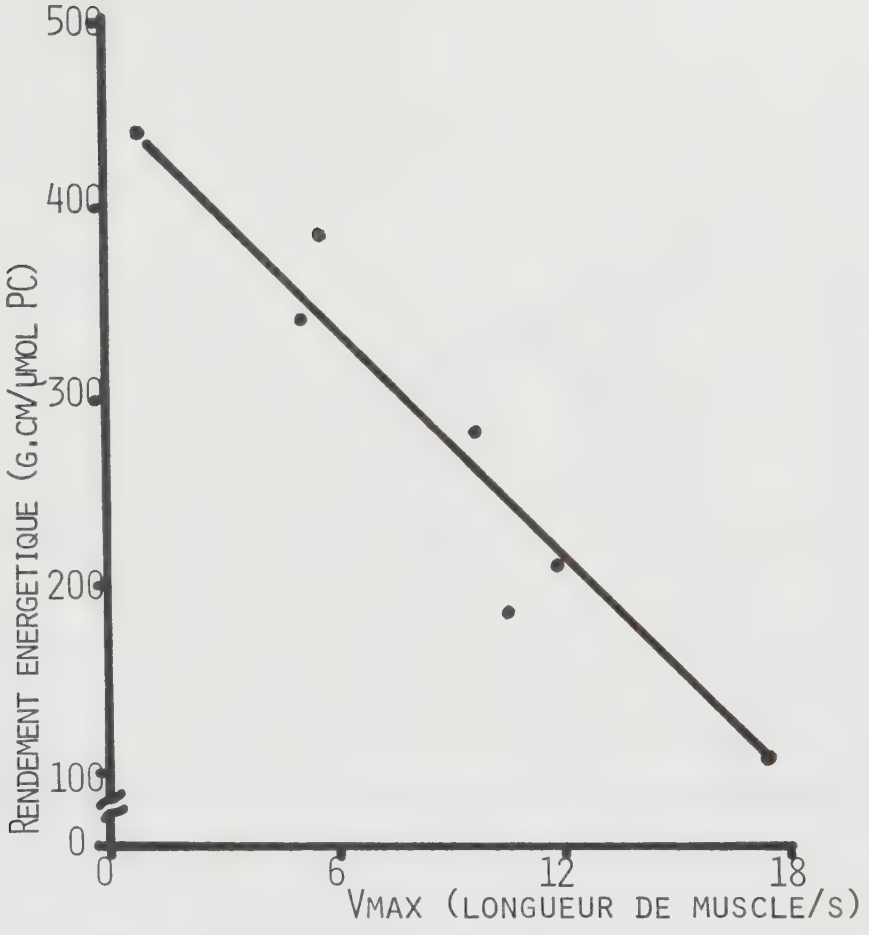


Figure 21 : Relation entre le rendement énergétique et la Vmax dans différents muscles squelettiques de vertébrés supérieurs (d'après Nwoye et Goldspink 1981).

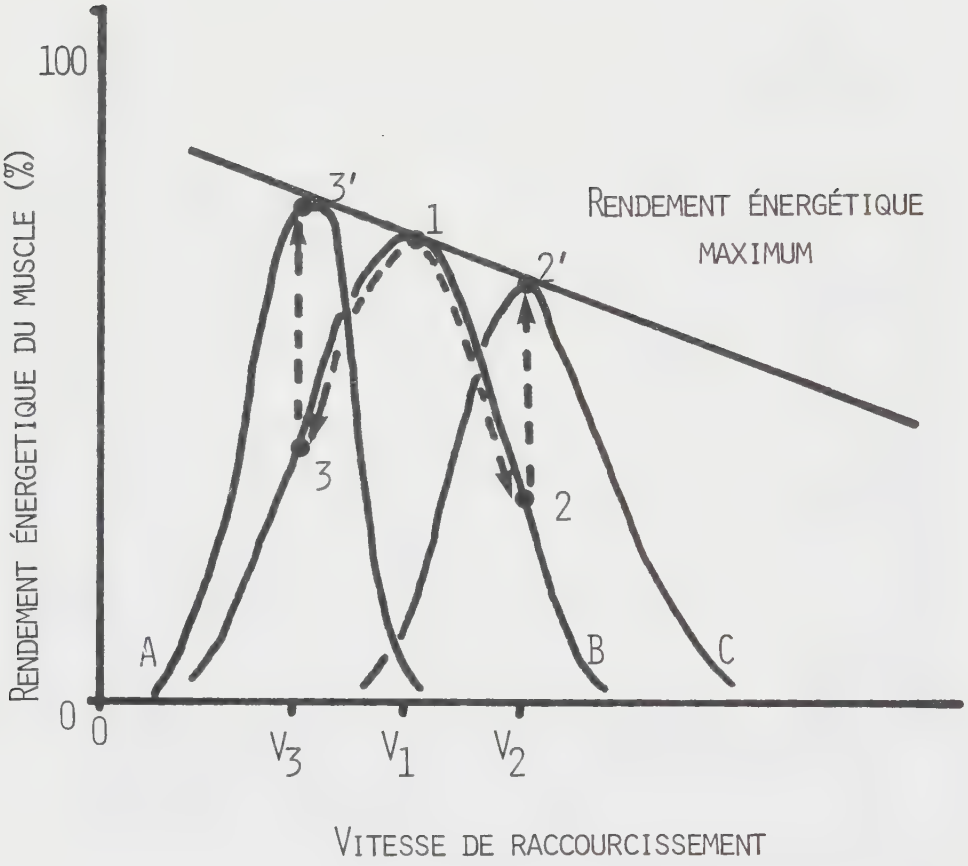


Figure 22 : Hypothèse de la variation de la myosine ATPase expliquée par le rendement énergétique de la fibre.

1 : vitesse de raccourcissement (V1)

2 : une augmentation de V1 entraîne une chute du rendement, qui ne peut être compensée qu'en changeant de courbe, c'est-à-dire en augmentant l'ATPase de la myosine (point 2'). Le rendement final est supérieur .

3 : Le même raisonnement appliqué à la baisse de V1.

A,B,C : courbes représentatives du rendement en fonction de la vitesse de contraction pour une valeur de la myosine ATPase respectivement faible, moyenne et élevée.

2.3. Pourquoi l'ATPase de la myosine varie-t-elle ?

On peut conclure des courbes représentées figure 20 que, si un muscle se contracte à une vitesse différente de sa vitesse physiologique, son rendement énergétique diminue. La consommation d'ATP devenant supérieure pour le même travail fourni, la tendance du muscle sera de retrouver un rendement maximal pour la nouvelle vitesse de raccourcissement utilisée. Cette hypothèse d'une adaptation énergétique à la contractilité est représentée figure 22. Chaque courbe en cloche de cette figure représente le lieu géométrique des rendements énergétiques obtenus en fonction de la vitesse de racourcissement, pour une valeur définie de l'ATPase de la myosine. Une variation de la vitesse de raccourcissement se traduisant par une baisse de rendement, la seule facon de l'augmenter sera de changer de courbe, c'est-à-dire modifier l'activité de la myosine ATPase. La conséquence est qu'une augmentation de la myosine ATPase se traduira par une faible diminution du rendement maximal. Les observations d'Alpert et Mulieri (1982) sur le coeur de lapin soumis à une surcharge de pression ou thyrotoxique conduisent à ces conclusions. L'augmentation de la post-charge secondaire à une surcharge de pression imposée brutalement (sténose aortique) entraîne obligatoirement une diminution de la vitesse maximale de raccourcissement. La modification de la myosine ATPase correspond donc bien, dans ce cas, à une réponse du système contractile à la diminution de rendement qui s'ensuit.

En conclusion, la variation de l'ATPase de la myosine peut s'expliquer comme une adaptation métabolique à un changement de contractilité imposé. Elle ne représente qu'un des aspects de l'adaptabilité cellulaire, et ne peut avoir un sens que si elle s'intègre dans un schéma d'ensemble concernant le métabolisme de la cellule. C'est ce qui est observé, en physiologie comme en pathologie.

3. LES MECANISMES DE VARIATION DE LA MYOSINE ATPase

Schématiquement, deux types de modifications peuvent être proposées : transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

3.1. Les modifications transcriptionnelles

Aucune variation de poids moléculaire des chaines légères n'est observée sur des myosines cardiaques d'espèces variées ou provenant

d'animaux traités par la thyroxine, qui ont des activités enzymatiques très différentes (articles 1, 2, 3). Les différences de poids moléculaire observées entre chaînes légères de myosine squelettique rapide, lente ou cardiaque ne peuvent donc être tenues pour responsables des différences d'activité observées, ainsi que cela a été supposé primitivement (Dreizen et Richards 1972, Stracher 1969, Weeds et Franks 1972).

L'hypothèse de l'existence d'isoenzymes de la myosine, formulée par Trayer et Perry (1966) pour expliquer les variations d'activité ATPase pendant le développement du muscle squelettique, et par Swynghedauw et al. (1976) dans le cas des surcharges cardiaques, s'est trouvée confirmée récemment (revue dans Lompré 1982). Schwartz et al (1977) ont montré que les myosines cardiaques présentaient une spécificité immunologique d'espèce, qui ne s'expliquait que par des différences de structure primaire. Par une technique d'electrophorèse en milieu non dissociant (d'Albis et Gratzer 1973), Hoh et al. (1978) ont mis en évidence trois isoformes de la myosine, appelées V1, V2 et V3 par ordre de mobilité électrophorétique décroissante, dans les ventricules du coeur de rat. L'activité enzymatique de V1 est supérieure à celle de V3 (Hoh et al. 1978, Lompré et al. 1979, 1981). L'activité enzymatique de V2, un hétérodimère V1-V3, est intermédiaire. Ces auteurs ont également montré que la proportion de V3 augmente aux dépens de V1 au cours du vieillissement et après hypophysectomie, deux situations dans lesquelles une baisse de l'activité ATPase de la myosine est connue (Alpert et al. 1974, Hjalmarson et al. 1970, Rovetto et al. 1972).

Dans toutes les espèces animales étudiées, une myosine ventriculaire de type V3 est majoritaire chez le foetus, et la forme V1 apparaît à la naissance. Au cours du développement post-natal, la myosine ventriculaire de rat ou de souris reste essentiellement de type V1, alors que les myosines de lapin ou de porc évoluent vers une forme V3 (Lompré et al. 1981). Toutefois, il reste toujours un pourcentage variable (de 5 à 37 %) de myosine V1 chez le lapin adulte (Martin et al. 1982). Les myosines ventriculaires de chien, de boeuf et d'homme adultes sont de type V3 (Clark et al. 1982, Lompré et al. 1981). Les variations d'activité enzymatique de la myosine en fonction de l'espèce s'expliquent donc par la variation du pourcentage des deux isoformes dans la myosine cardiaque. On peut également comprendre l'absence de variation de l'activité myosine

ATPase ventriculaire du rat traité par la thyroxine ou du lapin thyroidectomisé (Yazaki et Raben 1975) : la myosine cardiaque de ces animaux contenant, avant traitement, une forme très prédominante (V1 chez le rat et V3 chez le lapin), le passage d'une forme majoritaire (80 à 90%) à une forme unique (100%) changera très peu l'activité enzymatique.

Le classement des différentes myosines ventriculaires en forme V1 ou V3 ne signifie pas que toutes les myosines V1 ou V3 respectivement soient identiques entre elles. Des différences de mobilité électrophorétique sont en effet observées entre les myosines V1 d'une part et V3 d'autre part préparées à partir d'espèces différentes, qui correspondent vraisemblablement à de subtiles différences de structure primaire (Clark et al. 1982, Lompré 1981).

Il a été démontré, d'autre part, que les chaînes lourdes des myosines auriculaire et ventriculaire différaient par leurs compositions peptidiques après hydrolyse (Flink et al. 1978), leurs propriétés immunologiques (Dalla-Libera et Sartore 1981, Sartore et al. 1979, Schwartz et al. 1980) et leurs migrations électrophorétiques en conditions non-dissociantes (Clark et al. 1982, Hoh et al. 1978) chez le rat, le cobaye, le lapin et le porc. Il est vraisemblable que ces différences de structure primaire entre myosine auriculaire et ventriculaire existent chez toutes les espèces, comme le suggèrent les différences d'activité enzymatique constatées (Syrovy et al. 1979, Yazaki et al. 1979).

Lompré et al. (1979) et Mercadier et al. (1981) ont montré que la baisse d'activité ATPase de la myosine ventriculaire induite chez le rat par différents types de surcharges hémodynamiques est associée à un changement de la composition en isoformes de cette myosine. L'augmentation relative de la forme V3 dans la myosine cardiaque est corrélée à la baisse de contractilité (Vmax) observée sur les mêmes échantillons (Schwartz et al. 1981).

Une variation du schéma électrophorétique de la myosine ventriculaire de rat, associée à la variation de l'ATPase de la myosine, a été observée dans d'autres modèles : l'hypertension induite par sténose de l'artère rénale et la natation (Rupp 1981), le diabète induit par la streptozotocine (Malhotra et al. 1981), et au cours du développement ontogénique (Lompré et al. 1981).

L'augmentation de l'ATPase de la myosine ventriculaire au cours de

l'intoxication par la thyroxine montrée dans l'article 3 a également été observée par d'autres auteurs (Alpert et Mulieri 1981, Yazaki et Raben 1975). Ce modèle a suscité de nombreux travaux, et l'hypothèse de la synthèse d'une nouvelle forme de myosine ventriculaire, formulée plus haut, est maintenant démontrée. Martin et al. (1982) montrent que l'isoforme de myosine majoritaire dans le ventricule de lapin normal est V3 et devient progressivement V1 au cours du traitement par la thyroxine. Cette observation explique l'évolution progressive de l'activité enzymatique de la myosine. Des différences entre chaînes lourdes de myosine de lapin normal et hyperthyroïdien sont mises en évidence sur les cartes peptidiques obtenues après protéolyse (Chizonitte et al. 1982, Dalla-Libera et al. 1981, Sartore et al. 1981). Schwartz et al. (1982) observent dans le coeur de rat hypothyroïdien le remplacement de la myosine V1 par une myosine V3 dont la chaîne lourde est identique à celle de la myosine V3 cardiaque du foetus de rat. Dans ce modèle, le changement isoenzymique de la myosine V1 vers V3 est total, et il est possible d'affirmer, sur des critères immunologiques, électrophorétiques et d'analyse peptidique, que les myosines V1 et V3 ont des structures primaires différentes (Schwartz et al. 1982).

3.2. Le contrôle transcriptionnel

L'existence d'au moins deux chaînes lourdes de myosine α et β (Hoh et al. 1979) dans le coeur conduit à se demander à quel niveau se situe le contrôle de leur expression. Chez le lapin hyperthyroïdien, la vitesse de synthèse de la chaîne α est multipliée par trois, tandis que celle de la chaîne β diminue (Everett et al. 1983). L'analyse des acides nucléiques a révélé récemment l'existence de deux acides ribonucléiques messagers différents, correspondant à chacune des chaînes lourdes α et β dans le coeur du lapin (Sinha et al. 1982). La méthode utilisée consiste à isoler l'acide ribonucléique total de coeur hypothyroïdien ou thyrotoxique, puis l'acide ribonucléique messager poly-A^+ total et le purifier sur gradient de saccharose, préparer un acide désoxyribonucléique mono- puis double-brin complémentaire de l'acide ribonucléique messager, l'incorporer dans un plasmide utilisé pour transformer Escherischia coli, sélectionner les clones contenant des parties d'acide désoxyribonucléique complémentaire de l'acide ribonucléique messager de la chaîne lourde de

la myosine, et déterminer leur séquence. Ces sondes (les acides désoxyribonucléiques complémentaires) peuvent être rendues radio-actives par incorporation de ^{32}P. Leur association avec l'acide ribonucléique messager de coeur normal ou thyrotoxique puis l'hydrolyse du complexe par une nucléase dégradant les parties d'acide ribonucléique messager non associées à la sonde permet d'analyser la population d'acides ribonucléiques messagers présente dans le coeur. Le seul type de chaîne lourde de myosine exprimé (α dans le coeur de lapin hyperthyroïdien, β chez l'hypothyroïdien) correspond à un seul type d'acide ribonucléique messager présent dans chacun de ces coeurs. Il est donc prouvé que le contrôle de l'expression des chaînes lourdes par la thyroxine est au niveau des acides nucléiques.

Le mécanisme par lequel la thyroxine modifie l'expression de la myosine n'est pas déterminé. Deux possibilités existent : la synthèse de la myosine est due à un effet de la thyroxine au niveau du gène, ou elle est une réponse secondaire à ses effets périphériques (potentialisation de l'effet des catécholamines sur le myocarde, en partie inhibée par le propanolol, et augmentation du métabolisme basal entraînant une surcharge de travail cardiaque). L'augmentation de la vitesse de synthèse de la chaîne est décelée dès le premier jour de traitement hormonal (Everett et al. 1983). D'autre part, le propranolol n'empêche pas les modifications de l'ATPase de la myosine (article 3). Il est donc vraisemblable que la thyroxine affecte la synthèse des deux formes de myosine par une action directe sur le génome.

Combien existe-t-il de gènes différents des chaînes lourdes de myosine ? En plus des deux gènes des chaînes α et β, Mahdavi et al. (1982) ont caractérisé dans le coeur de rat deux clones correspondant à deux chaînes lourdes qui pourraient être des isoformes de V1. Sur la base du nombre de clones identifiés dans différents tissus, il existe sept gènes au moins pour Sinha et al. (1982) et onze au moins pour Wydro et al. (1983). Les techniques d'analyse des acides nucléiques comme celle décrite plus haut, actuellement en phase de développement, doivent apporter les réponses aux questions concernant le contrôle de l'expression des protéines contractiles en physiologie ou en pathologie.

En conclusion, l'existence de deux grands types d'isoenzymes de la myosine dans le coeur de toutes les espèces étudiées, coexistant dans la

même cellule (Samuel et al. 1983), explique un grand nombre des observations effectuées sur les modifications de l'activité enzymatique de la myosine dans différentes situations physio-pathologiques.

Certaines situations existent, toutefois, dans lesquelles la variation de l'ATPase de la myosine s'explique difficilement par le jeu des isoenzymes. Il s'agit, par exemple, des baisses d'activité ATPase observées dans l'hypertrophie par surcharge mécanique, chez des espèces comme le chien ou l'homme qui, à l'état normal adulte, possèdent une myosine ventriculaire constituée pratiquement uniquement de la forme V3. Il faut donc, dans ces cas, invoquer soit l'existence d'isomyosines non actuellement différenciées, soit un autre mécanisme de contrôle de l'ATPase. Cette possibilité est discutée dans le paragraphe suivant.

4. LA PHOSPHORYLATION DE LA MYOSINE

La modification post-transcriptionnelle de la myosine par phosphorylation est-elle impliquée dans l'adaptation cardiaque à une surcharge de travail ? Pour répondre à cette question, il fallait choisir un modèle dans lequel la variation d'activité enzymatique de la myosine, et donc de contractilité, fût importante pour mettre clairement en évidence une relation entre ces paramètres et la phosphorylation. La surcharge mécanique a été préférée au traitement par la thyroxine car c'est un modèle plus simple et dont le mécanisme est mieux connu. Au cours de la phase chronique de la surcharge mécanique cardiaque chez le rat, l'activité ATPase de la myosine est abaissée, mais il n'y a pas de changement de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine ni de l'activité de la myosine kinase. Comme confirmation d'un rôle possible de la phosphorylation de la myosine dans le coeur, le marquage de la myosine kinase et de la calmoduline par immunofluorescence révèle que ces protéines sont régulièrement distribuées dans les myofibrilles. Enfin, parallèlement à la myosine kinase, une autre activité kinase calmoduline-dépendante est mise en évidence dans le coeur de rat. D'une manière générale, la connaissance des systèmes contrôlés par la calmoduline est importante, compte tenu de la fonction de messager intracellulaire du message calcique remplie par la calmoduline. La mise en évidence d'une nouvelle activité kinase calmoduline-dépendante dans le

coeur demande donc à être suivie de l'identification du substrat et de sa place dans le métabolisme.

Au cours de ces recherches, les difficultés techniques rencontrées, tenant à la nature du tissu cardiaque, ont été grandes. Cet aspect du travail sera discuté en premier lieu, pour ensuite dégager la signification des résultats présentés.

4.1. La myosine kinase du coeur de rat

La préparation de myosine kinase purifiée à partir du coeur de rat contient une protéine majoritaire de poids moléculaire 63.000, qui peut correspondre à la myosine kinase (article 4, figure 5). Ce poids moléculaire est proche de celui décrit par Rappaport et Adelstein (1980) pour la kinase du coeur de chien. Les poids moléculaires de la myosine kinase cardiaque varient entre 65.000 et 94.000 (Rappaport et Adelstein 1980, Walsh et al. 1979, Wolf et Hofmann 1980) pour l'enzyme purifiée, valeurs confirmées par les marquages immunologiques (Cavadore et al. 1982, Nunnally et Stull 1983). Il semble donc que l'enzyme cardiaque, comme l'enzyme squelettique, ait un poids moléculaire plus faible que l'enzyme du muscle lisse (125.000 environ). Les différences de poids moléculaire, d'activité et de phosphorylation décrites par les différents auteurs ayant étudié la myosine kinase ont été imputées à la protéolyse. C'est certainement un facteur majeur, mais ces observations peuvent aussi signifier l'existence d'iso-myosine kinases, spécifiques d'un type de tissu.

La myosine kinase du coeur de rat phosphoryle les chaînes légères cardiaques ou squelettiques à la même vitesse (article 4). Cette observation est en accord avec les résultats obtenus par Walsh et al. (1979) avec la myosine kinase cardiaque de boeuf. Cependant, Wolf et Hofmann (1980) purifie une myosine kinase de coeur de boeuf ayant une nette spécificité pour la chaîne légère homologue, une propriété décrite par Adelstein et Klee (1981) à propos de la myosine kinase de muscle lisse. La myosine kinase de coeur de rat a une activité enzymatique de l'ordre de 7 nmol P. min^{-1}. mg^{-1}, ce qui est du même ordre de grandeur que celle de coeur de boeuf purifiée par Walsh et al. (1979). Les enzymes purifiées à partir du coeur de boeuf par Wolf et Hofmann (1980) et du muscle lisse par Adelstein et Klee (1981) ont une activité enzymatique

supérieure. Il semble donc qu'il existe une relation entre activité enzymatique et spécificité de substrat. Plusieurs auteurs se réfèrent aux travaux de Frearson et al. (1976a) pour affirmer que l'activité myosine kinase du tissu cardiaque -i.e. le produit de son activité spécifique par sa concentration tissulaire- est faible comparée aux autre types de muscle. Or cette activité était dosée dans l'homogénat total tissulaire. Les activités myosine kinase mesurées dans le surnageant d'un homogénat cardiaque de rat (article 4) ou dans l'homogénat lui-même sont effectivement très faibles et surtout peu reproductibles. Des expériences préliminaires, non décrites, ont montré que l'activité enzymatique dans ces fractions décroissait de 50% en une heure à 0°C, ce qui reflète la présence probable de protéases et de phosphatases dans l'homogénat. Il est donc nécessaire de purifier la myosine kinase pour en tirer des conclusions valables concernant son activité dans le tissu.

La présence d'une activité protéolytique importante dans le tissu cardiaque et la sensibilité de la myosine kinase à la protéolyse sont des facteurs qui rendent la purification de cette enzyme difficile. Un des premiers effets de la protéolyse est l'apparition d'une activité enzymatique indépendante du Ca^{2+} et de la calmoduline. Dans une série d'expériences préliminaires, la myosine kinase de coeur de rat purifiée en absence d'inhibiteurs des protéases par chromatographie sur DEAE-cellulose était composée de deux fractions dont l'une était active en absence de Ca^{2+} (figure 23 A). La même préparation à partir de coeur hypertrophié contenait une activité myosine kinase totale supérieure, l'augmentation portant surtout sur la fraction Ca^{2+}-indépendante (figure 23 B). La figure 24 montre les résultats d'une purification de myosine kinase par chromatographie sur DEAE-cellulose à partir d'un mélange de muscle squelettique de lapin et de coeur de rat. Le profil A représente l'activité kinase du muscle squelettique seul. En B et C, une partie du muscle squelettique est remplacée par du coeur normal (20% en B et 50% en C). En D, le coeur normal est remplacé par du coeur hypertrophié. Il est important de souligner que les profils d'activité myosine kinase obtenus représentent pratiquement l'activité du muscle squelettique seul, car l'activité cardiaque est très faible (figure 23), et se situe environ au niveau de l'activité Ca^{2+}-indépendante qui apparaît en traits pointillés sur les figures 24 B, C, et D. Ces quatre

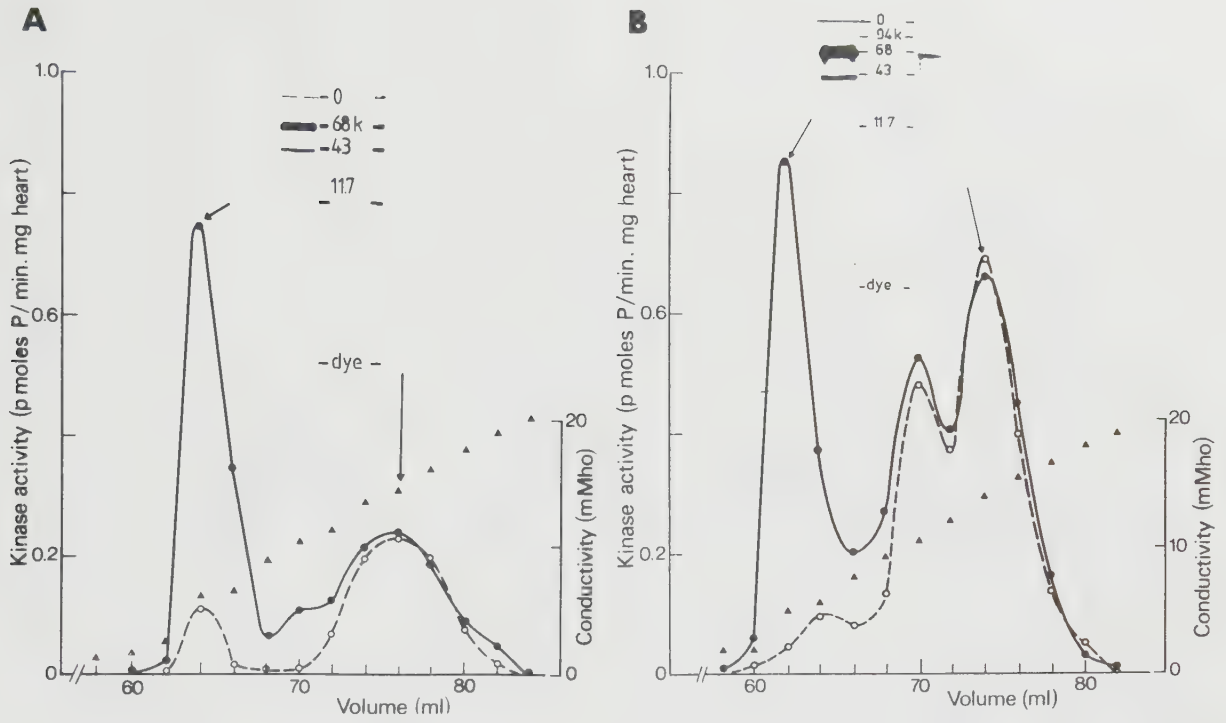


Figure 23 : Chromatographie sur DEAE-cellulose de l'activité kinase de coeur de rat normal (A) ou hypertrophié (B) dosée par incubation de chaque fraction en présence de chaînes légères de myosine et Ca^{2+} (traits continus) ou EGTA (traits pointillés). Encart : Les fractions correspondant aux pics d'activité N°1 et 2 sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) en présence de SDS.

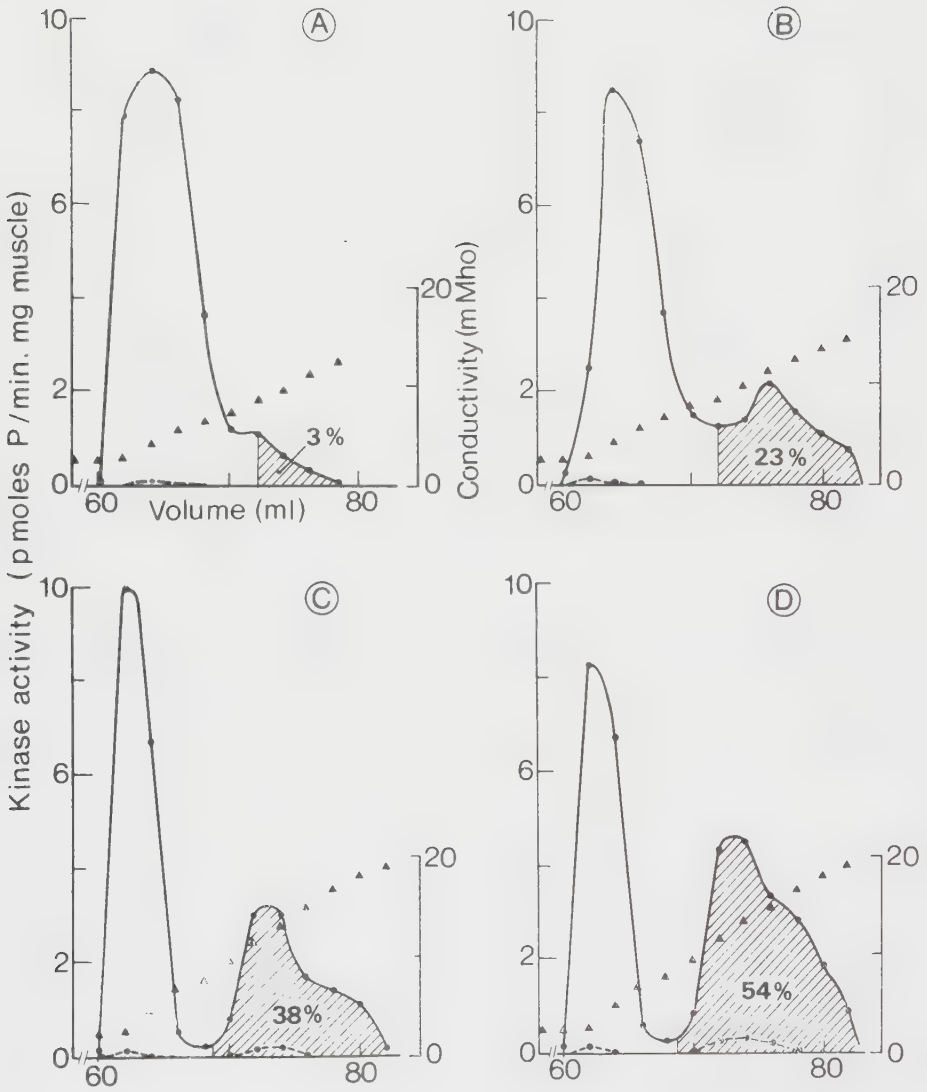


Figure 24 : Chromatographie sur DEAE cellulose de myosine kinase préparée à partir des échantillons suivants :

muscle squelettique blanc de lapin : 1 g (A), 0,8 g (B), 0,5 g (C et D) + coeur de rat normal : 0,2 g (B) et 0,5 g (C) ou coeur de rat hypertrophié (120%) : 0,5 g (D). Les chiffres dans la zone hachurée représentent le pourcentage de l'activité totale représenté par le pic $n^{o}2$.

L'activité kinase est mesurée en présence de Ca^{2+} 2 mM (●—●) ou EGTA 7,5 mM (●---●); ▲▲▲ : conductivité.

schémas montrent l'apparition d'un second pic d'activité Ca^{2+}-dépendante dont l'importance relative à l'activité totale augmente en fonction du pourcentage de tissu cardiaque dans l'extrait initial. Ce deuxième pic est encore plus important si le coeur normal est remplacé par du coeur hypertrophié (figure 24 D). L'explication la plus plausible de l'apparition de ce second pic d'activité est la protéolyse partielle de la myosine kinase squelettique par une protéase présente dans l'extrait cardiaque. Une observation récente de Srivastava et Hartshorne (1983) montre l'apparition similaire d'un second pic d'activité myosine kinase Ca^{2+}-indépendante sur DEAE-cellulose après protéolyse partielle de myosine kinase de muscle squelettique par la chymotrypsine. Ce résultat est à rapprocher de celui décrit figure 24. La différence entre ces deux résultats concernant la dépendance de cette activité vis à vis du Ca^{2+} peut être due aux conditions contrôlées de la protéolyse dans l'expérience de Srivastava et Hartshorne. Si ces conclusions sont exactes, la comparaison des figures 24 C et D suggère que le coeur hypertrophié contient une activité protéolytique supérieure à celle du coeur normal. Le contrôle de la protéolyse est donc indispensable au cours de la purification de cette enzyme et les activités myosine kinase de coeur normal et hypertrophié ne peuvent être comparées qu'à cette condition. L'article 4 décrit les résultats obtenus en utilisant un mélange d'inhibiteurs des protéases. Leur efficacité n'est pas totale, mais l'activité Ca^{2+}- et calmoduline-indépendante est réduite, et le second pic d'activité Ca^{2+}-indépendante observé après chromatographie sur DEAE-cellulose (figure 23) a disparu (article 4, figure 1).

La faible activité enzymatique cardiaque comparée à celles d'autres types de muscle conduit à se demander si la myosine kinase n'est pas une protéine mineure dans le coeur. Les marquages par immunofluorescence ne peuvent pas apporter de renseignement sur la concentration cardiaque de la myosine kinase. Par contre, ils prouvent que la myosine kinase est un constituant du sarcomère du myocyte cardiaque et non un contaminant d'origine vasculaire. Ce résultat est fondamental. Le tableau VI présente les concentrations tissulaires de myosine kinase relevées dans la littérature ou calculées à partir des tableaux de purification publiés par plusieurs auteurs. Nous avons fait le même calcul sur la kinase préparée à partir du coeur de rat, en lui attribuant arbitrairement un poids

TABLEAU VI

Concentrations tissulaires de la myosine kinase exprimées en µmol/kg de tissu.

Muscle	Concentration	Auteurs
lisse	1,2	Adelstein et Klee 1981
	0,8	Walsh et al. 1982b
squelettique	0,73	Pires et Perry 1981
	4,3	Walsh et Guilleux 1981
coeur	0,63	Walsh et al. 1979
	0,002	Wolf et Hofmann 1980

moléculaire de 63.000 et trouvons une concentration de 1,25 µMol/kg de tissu. Même si le poids moléculaire réel est inférieur de 50 %, la concentration calculée reste dans la zone trouvée par l'ensemble des auteurs. Ce faisceau d'arguments, et la localisation identique de la myosine kinase et de la calmoduline montrée par l'immunofluorescence, renforcent l'hypothèse que la phosphorylation de la myosine peut jouer un rôle dans le contrôle de la contraction cardiaque. Le marquage de la myosine kinase par immunofluorescence révèle sa présence au niveau de la bande de myosine du sarcomère, dans le myocyte isolé. Plusieurs auteurs ont localisé par immunofluorescence la myosine kinase cardiaque au niveau de l'actine (Cavadore et al. 1982, Guerriero et al. 1981). Le marquage de myosine kinase obtenu par Guerriero et al. (1981) sur des myofibrilles cardiaques se présente comme une double bande encadrant la ligne Z, tandis que celui obtenu sur le myocyte isolé est une simple bande au niveau de la bande A. Par rapport à la coupe tissulaire ou aux myofibrilles peu purifiées, le myocyte isolé est une structure de laquelle beaucoup de constituants ont été enlevés par la perméabilisation et la fixation. Les protéines solubles, comme la calmoduline, ont disparu ainsi que le prouve le fin réseau de cette protéine associé aux myofibrilles. On sait que la calmoduline existe dans la cellule à forte concentration et en association avec de nombreux systèmes. Il est vraisemblable que l'image obtenue dans le myocyte correspond à une forme de calmoduline fortement liée aux structures en place. Le même raisonnement est applicable à la myosine kinase. La forme soluble de cette enzyme, décrite dans l'article 4, est certainement absente du myocyte isolé, et le marquage immunofluorescent montré figure 16 correspondrait à une forme liée aux myofibrilles. Si cette interprétation est correcte, l'ensemble de ces résultats et de ceux des autres équipes est cohérent, et suggérerait que les formes soluble et myofibrillaire de la myosine kinase n'ont pas la même localisation sur le sarcomère. Une forme de la myosine kinase du muscle strié fortement associée aux myofibrilles a été décrite par Walsh et Guilleux (1981). Au cours d'un stage effectué dans le laboratoire dirigé par le professeur Demaille, la purification de cette forme insoluble de myosine kinase a été essayée à partir de myofibrilles de coeur de rat. La figure 25 montre la composition des fractions séparées par chromatographie sur sepharose CL6B. L'activité myosine kinase est détectée dans les fractions 34 à 44, qui

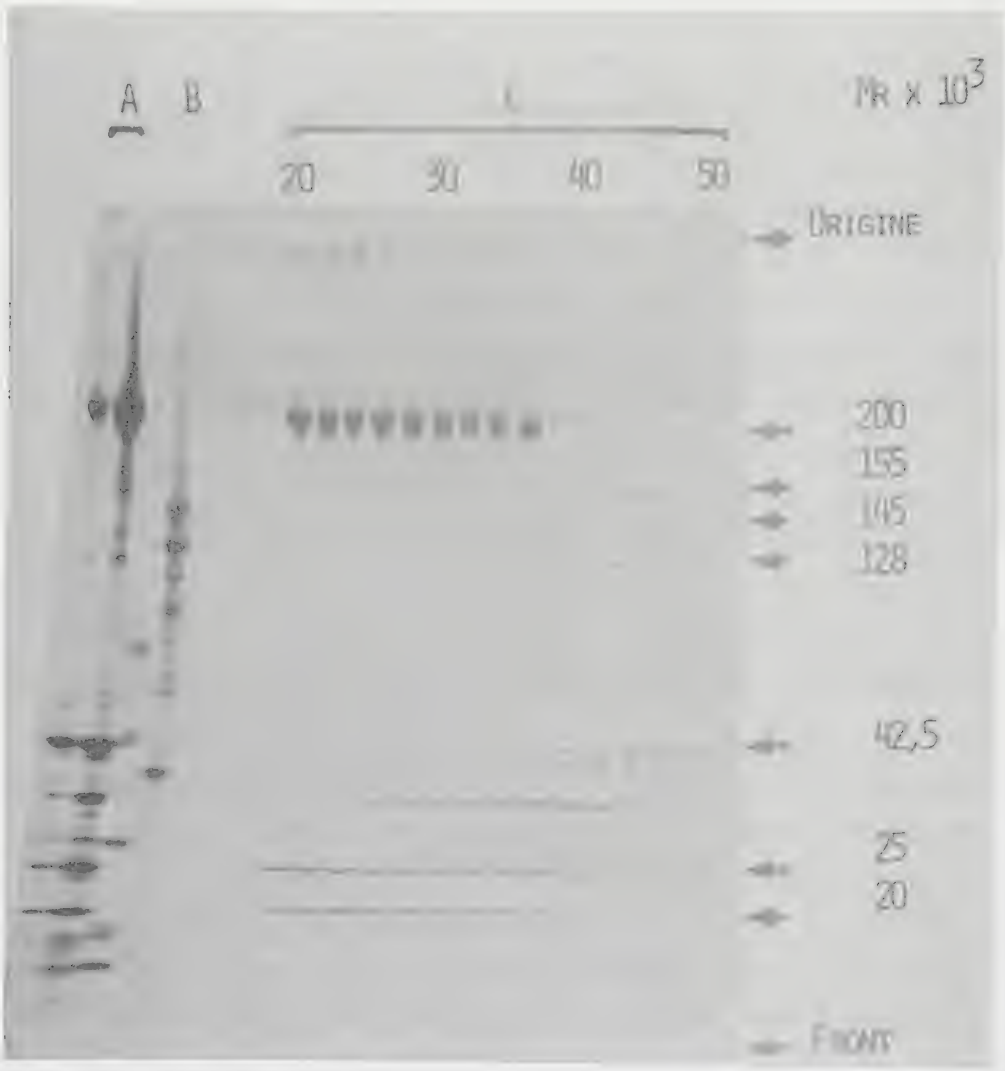


Figure 25 : Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (5-15%) des fractions obtenues après chromatographie de la myosine kinase myofibrillaire de coeur de rat sur sepharose CL B6. L'activité myosine kinase est contenue dans les fractions 34 à 44 (A : myofibrilles de coeur de rat; B : protéines étalons de poids moléculaire; C : fractions éluées de la colonne de sepharose CL6B).

contiennent la myosine et l'actine. Des interactions fortes existent entre ces protéines et la myosine kinase puisque la séparation n'a pas été possible par chromatographie par filtration ou par échange d'ions. Si l'existence de deux formes de la myosine kinase, soluble et myofibrillaire, est indiquée par de nombreuses observations, la relation qui existe entre elles reste à déterminer.

4.2. Rôle de la phosphorylation de la myosine

L'activité de la myosine kinase et le niveau de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine ne sont pas modifiés dans le coeur du rat hypertrophié. L'hypothèse était que la phosphorylation de L2 pouvait expliquer en partie les variations d'ATPase de la myosine non imputables à la redistribution isoenzymique. L'ensemble de ces résultats montre que si ces deux phénomènes sont reliés, le lien n'est pas direct. Il n'y a pas dans la surcharge mécanique cardiaque la corrélation entre phosphorylation de la chaîne légère et l'ATPase de la myosine décrite par Resink et al. (1981) dans le coeur du rat entrainé à courir. La tendance à la diminution de la phosphorylation de L2 observée dans les très grosses hypertrophies est sans doute à rapprocher des résultats de Carey et al. (1981) qui décrivent un effondrement de la phosphorylation de L2 dans l'insuffisance cardiaque du chat. En effet, les coeurs très hypertrophiés évoluent lentement vers l'insuffisance, et chez quelques rats en insuffisance cardiaque, le niveau de phosphorylation de la chaîne légère était abaissé. Le coeur se trouve alors dans des conditions métaboliques très différentes de la normale, qui interdisent d'en tirer des conclusions d'ordre fonctionnel.

Des observations effectuées sur la myosine de muscle lisse ou de cellules non musculaires ont montré un effet de la phosphorylation sur la forme de la molécule et sa capacité à former des filaments (Craig et al. 1983, Martin et al. 1981, Scholey et al. 1980). Si cet effet existe dans le muscle strié, il est logique de chercher à le mettre en évidence lorsque de nouveaux sarcomères se mettent en place comme c'est le cas dans le coeur en phase d'hypertrophie. Aucune différence de phosphorylation de L2 n'a été observée chez des rats soumis à une sténose serrée de 24 h, ce qui suggère que l'assemblage des myofilaments cardiaques ne dépend pas de la phosphorylation de la myosine.

Des expériences récentes montrent qu'il faut chercher un effet de la phosphorylation sur le muscle entier : Cooke et al. (1982) observent une diminution de 50% de l'ATPase de la myosine du muscle squelettique après phosphorylation de L2 uniquement sur les fibres glycérinées ou les myofibrilles faiblement liées par 0,01% glutaraldéhyde, mais pas sur les myofibrilles non liées. Pour Crow et Kushmerick (1982) la phosphorylation de L2 entraîne une réduction de l'ATPase du muscle squelettique rapide puisque la dépense énergétique du muscle décroît après 12 secondes de tétanos. Cette expérience et une observation préliminaire de Sweeney et al. (1983) montrent que la Vmax de la fibre diminue de 50-60% lorsque la phosphorylation de L2 augmente de 0,2 à 0,6 mole P/ mole L2 environ. Des variations de certains paramètres contractiles du myocarde sont observées lorsque la phosphorylation de L2 est obtenue par intervention de la myosine kinase. Ces résultats sont résumés dans le tableau VII. Les observations préliminaires de Ruegg et al. (1982) et Franks et al. (1983), montrant une baisse de l'ATPase myofibrillaire et de la Vmax concordent avec celles obtenues sur le muscle squelettique et tendraient à prouver qu'un effet de la phosphorylation de L2 sur l'ATPase de la myosine n'est observable que si l'architecture musculaire est conservée. Ces résultats intéressants sont encore préliminaires et, surtout, obtenus par phosphorylation exogène de L2. Il reste à prouver que ce système puisse être activé dans le coeur et à trouver le stimulus adéquat.

TABLEAU VII

EFFETS DE LA VARIATION DE PHOSPHORYLATION DE L2 DANS LE COEUR

Auteurs	Année	Préparation	Effets de la phosphorylation de L2
Holroyde et al.	79 a	porc; myosine	liaison Ca^{2+} inchangée
Bhan et al.	81	chien; myosine sans L2	lève inhibition de l'ATPase produite par L2
Kerrick et al.	81	lapin; fibres pelées	tension active inchangée
Resink et al.	81 b	rat; course	corrélation avec Ca^{2+} ATPase de la myosine
Ruegg et al.	82	porc; fibres glycérinées	↙ ATPase des myofibrilles (25%) et vitesse de contraction (50%)
Franks et al.	83	lapin et rat; myofibrilles liées par glutaraldéhyde	↙ ATPase (50%) et Vmax (33%)

5. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA BIOLOGIE DES SURCHARGES CARDIAQUES

(article 6)

5.1. RESUME

Le but de cette revue est de faire le point sur les mécanismes d'adaptation utilisés par le coeur lorsqu'il est soumis à une surcharge de travail. Cette étude se restreint aux surcharges dites mécaniques pathologiques ou expérimentales, i.e. secondaires à une maladie valvulaire, une sténose aortique, une hypertension artérielle chronique ou un infarctus myocardique.

5.1.1. Les modèles :

Les principaux modèles expérimentaux utilisés dans ce type d'étude sont les suivants :

5.1.1.1. Surcharges de pression

a/ sténose aortique (rat, lapin) ou de l'artère pulmonaire (lapin, chat, chien); cette surcharge entraîne rapidement une hypertrophie cardiaque de 50 à 80 %.

b/ hypertension artérielle (rat) expérimentale ou génétique; l'hypertrophie ateint 30 à 50 %.

5.1.1.2. Surcharges de volume

a/ insuffisance aortique (rat, lapin) : l'hypertrophie compensatrice se développe plus lentement, pour atteindre 40 % environ.

b/ fistule aorto-cave (rat) : l'hypertrophie se développe lentement et peut atteindre 100 %.

5.1.1.3. Surcharges mixtes

Sténose, suivie d'une insuffisance aortique (rat) : l'hypertrophie est généralement comprise entre 80 et 120 %.

5.1.2. Les mécanismes cardiaques d'adaptation à la surcharge

5.1.2.1. L'hypertrophie

L'hypertrophie du myocarde, secondaire à l'hypertrophie des myocytes et à l'hyperplasie des cellules conjonctives et endothéliales, est une réponse caractéristique d'une surcharge de travail cardiaque. En permettant un débit cardiaque normal, elle évite l'apparition de la

défaillance cardiaque.

Les myocytes cardiaques ne se divisent pas dans le coeur surchargé, sauf peut-être dans les très grosses hypertrophies. Les cellules non musculaires subissent une hypertrophie modérée. La concentration cardiaque en acide désoxyribonucléique ne varie pas au cours de l'hypertrophie. Chez l'homme, on note une augmentation de l'acide désoxyribonucléique cardiaque total, qui peut correspondre à une division des myocytes. Il faut signaler qu'il a été impossible, jusqu'ici, de reproduire expérimentalement l'hypertrophie très importante (200 à 300 %) observée en pathologie humaine. Le coeur humain présente d'ailleurs des caractéristiques originales, comme son degré de ploïdie très élevé (72 % des noyaux myocytaires du coeur humain normal sont tétraploïdes), qui augmente au cours de l'hypertrophie (on peut trouver jusqu'à 50 % de noyaux myocytaires octoploïdes). Il est possible que ce phénomène soit à la base de divisions non mitotiques.

La stimulation de la synthèse protéique menant à l'hypertrophie est très précoce dans les surcharges de pression, plus tardive dans les surcharges de volume. La synthèse protéique augmente de 2 à 4 fois puis revient à la normale au cours de la phase chronique de l'hypertrophie.

L'augmentation de la synthèse de l'acide ribonucléique est attestée par une augmentation du nombre des nucléoles et une augmentation de la concentration en acide ribonucléique total. Il est vraisemblable que la concentration en acide ribonucléique messager soit augmentée. Un des indices les plus précoces de la stimulation de la synthèse protéique est l'augmentation de l'activité acide ribonucléique polymérase. Le signal biochimique initiateur de ces phénomènes est actuellement inconnu. Le facteur déclenchant peut être une augmentation de la contrainte pariétale (= pression x rayon / 2 x épaisseur paroi), existant aussi bien dans les surcharges de pression que de volume. Il est logique de penser qu'une augmentation de la pression intraventriculaire (surcharge de pression) ou du rayon de la cavité (surcharge de volume) entrainent également une augmentation de l'épaisseur de la paroi (hypertrophie) pour ramener la contrainte pariétale à une valeur normale.

5.1.2.2. Les modifications de l'expression génétique

L'hypertrophie, constante dans le coeur surchargé, n'est qu'une des manifestations de l'adaptation à la surcharge. Des modifications des propriétés de plusieurs protéines ont été mises en évidence et ont permis de conclure à une réorientation concertée du métabolisme cellulaire vers un état énergétiquement plus rentable.

Le potentiel de repos membranaire est légèrement modifié, ce qui suggère une altération de la Mg-Na-K-ATPase. Le potentiel d'action est allongé par rapport au normal, en relation avec la diminution de contractilité observée dans le coeur hypertrophié. Des mesures indirectes permettent de penser que les flux calciques sont diminués dans la cellule du coeur hypertrophié, et une diminution de la Ca^{2+}-ATPase ainsi que du pompage calcique du reticulum sarcoplasmique a été mise en évidence.

La diminution de l'ATPase de la myosine est, dans les surcharges de pression, corrélée avec l'hypertrophie et la diminution de la Vmax. Par contre, dans les surcharges de volume, l'ATPase de la myosine est normale ou faiblement diminuée, sans corrélation avec l'hypertrophie. Les variations de cette activité enzymatique s'expliquent par la synthèse d'une isoenzyme de la myosine à faible activité enzymatique dans le cas du rat ou du lapin. La masse totale et le nombre des mitochondries augmente, mais leur taille diminue, dans le coeur hypertrophié. L'augmentation de la surface d'échange va de pair avec une fonction mitochondriale vraisemblablement augmentée dans la phase d'hypertrophie compensée, qui explique les concentrations en ATP et phosphocréatine normales malgré l'augmentaton de travail. La cytochrome-oxydase possède une affinité pour l'oxygène augmentée. La respiration mitochondriale est par contre diminuée, avec découplage P/O, au cours de la phase d'insuffisance, mais l'apparition de celle-ci ne peut s'expliquer par un défaut de production d'énergie.

Quelle est la finalité de ces modifications métaboliques ? La contractilité est diminuée dans les surcharges de pression (diminution de Vmax), et normale ou faiblement diminuée dans les surcharges de volume. La diminution de la vitesse de contraction due à l'augmentation de la pré-charge ou post-charge (suivant le type de surcharge) entraîne le coeur à travailler avec un rendement énergétique abaissé, si on admet que le coeur, comme tout muscle, se contracte physiologiquement à la vitesse

permettant le meilleur rendement. La baisse de rendement énergétique, c'est-à-dire la surconsommation d'ATP pour le même travail, peut être le signal entraînant les modifications métaboliques citées plus haut, et qui ont pour but d'adapter le coeur hypertrophié à une contraction plus lente. La diminution de l'ATPase de la myosine serait le moyen de retrouver un rendement énergétique optimal.

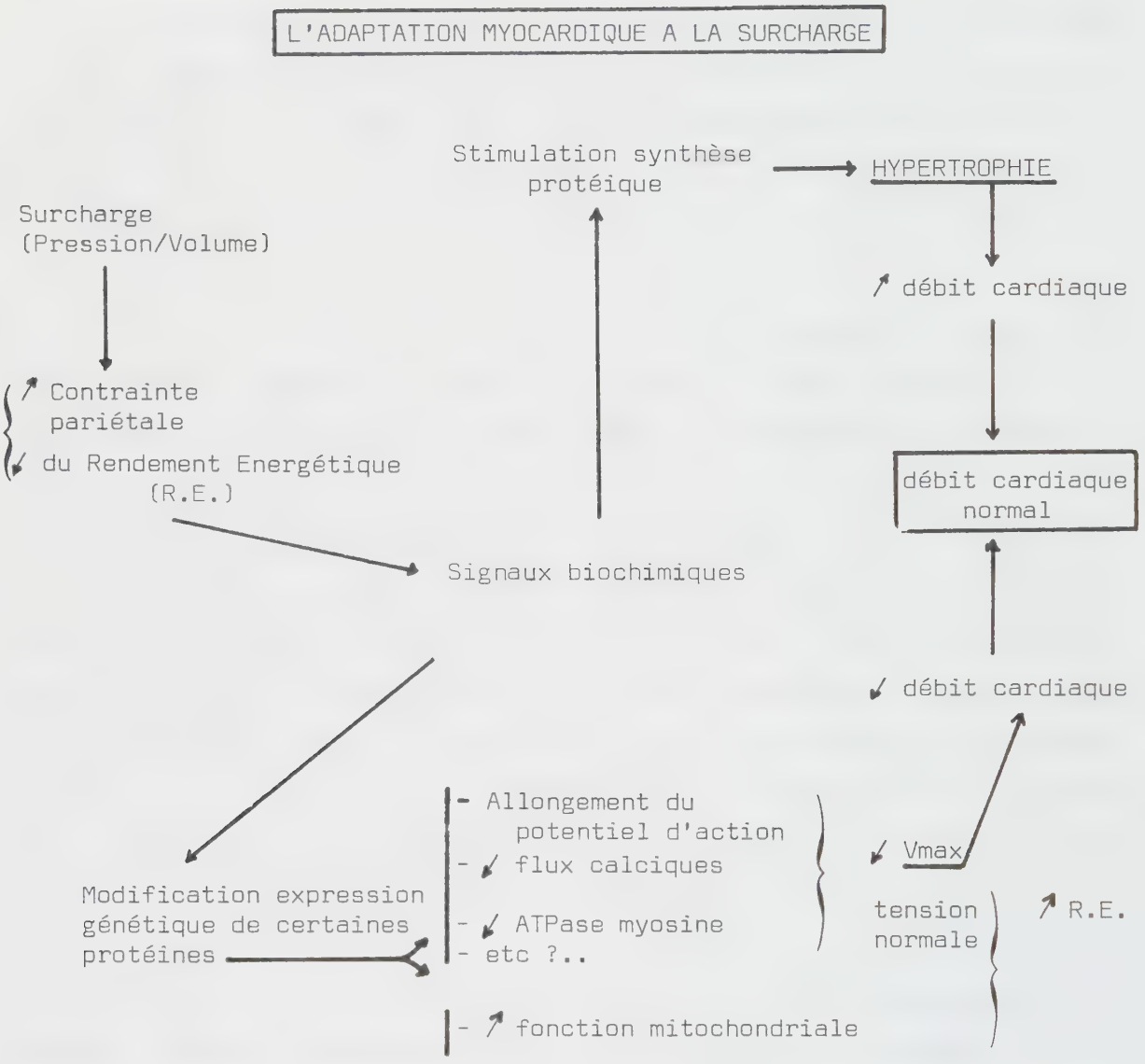
5.1.3. Conclusion

Le schéma suivant a pour but de faire la synthèse : les deux types d'adaptation, hypertrophie et modifications phénotypiques, répondent à des finalités différentes. La diminution de contractilité forcée (nette surtout dans les surcharges de pression) entraîne le coeur à modifier sa production (mitochondries) et sa consommation (myosine ATPase, flux calciques) d'énergie. Il s'agit donc bien d'une adaptation. Ce ralentissement mécanique est par contre préjudiciable à la fonction hémodynamique cardiaque, puisqu'il tend vers une baisse du débit cardiaque. En réponse, le coeur s'hypertrophie et ceci constitue donc une adaptation mécanique à but hémodynamique.

5.1.4. Schéma : l'adaptation myocardique à la surcharge

5.2. ARTICLE 6

Swynghedauw B, Delcayre C (1982) Biology of cardiac overload. Pathobiology Annual 12, 137-183


L'ADAPTATION MYOCARDIQUE A LA SURCHARGE
Stimulation synthèse protéique
HYPERTROPHIE
Surcharge (Pression/Volume)
↗ débit cardiaque
↗ Contrainte pariétale
↙ du Rendement Energétique (R.E.)
débit cardiaque normal
Signaux biochimiques
↙ débit cardiaque
- Allongement du potentiel d'action
- ↙ flux calciques
↙ Vmax
Modification expression génétique de certaines protéines
- ↙ ATPase myosine
- etc ?..
tension normale
↗ R.E.
- ↗ fonction mitochondriale

ARTICLE 6

Pathobiology Annual 1982, Vol. 12,
edited by Harry L. Ioachim.
Raven Press, New York © 1982.

Biology of Cardiac Overload

Bernard Swynghedauw and Claude Delcayre

U 127 INSERM, Hôpital Lariboisière, 75010 Paris, France

Mechanical cardiac overload is generally tolerated over a long period because of the development of several adaptational factors, both in the myocardium itself and in the vessels or in the blood. The reaction of a myocardial fiber to chronic overload is basically the same as that of a skeletal muscle; however, the consequences of this adaptation at the level of the whole organ are extremely different because of the geometry of the heart.

Two fundamental processes adapt the heart to a chronic enhancement of work: (a) hypertrophy due to a multiplication of sarcomeres, and (b) an increased efficiency of contraction of each sarcomere. As will be shown later, a larger fiber whose Ca^{2+} movements and shortening velocity are slower, and in which the oxygen is more efficiently used, is better adapted to an increased pre- or after-load. When the heart is considered as a pump, the problem is entirely different: a decrease in the speed of shortening will depress cardiac output and must be compensated, for example, by the intervention of either the Starling law or adrenergic mechanisms, or by the hypertrophy itself. Hypertrophy may compensate for overloading, but could be inadequate if wall stress increases.

To date, we do not know how to reconcile these two conflicting aspects. It must be emphasized, however, that the beneficial process of cardiac hypertrophy can, in fact, be considered as a heart disease because of cardiac geometry. In this view, the lowered maximum shortening velocity is also a fundamentally beneficial process, since it allows the heart to develop a normal tension at the expense of its velocity.

Heart failure thus appears less as a disease, such as cancer, than as an index showing the limits of myocardial adaptation. The classical debate on whether the heart fails because of a defective energy production, or because of an abnormality in energy utilization (187) seems to be outdated. The heart fails when all the extreme possibilities of adaptation have been used. For example, when we are dealing with an isoenzymic type of adaptation, the limit is indicated by a complete reversal of normal isoenzyme distribution.

In the past many investigators studied cardiac overload during the failure phase and frequently obtained such an evolution immediately after the operation. It is now considered more valid to develop investigations on the compensatory phase in order to recognize its limits and therefore the origin of failure.

The goal of this review is to explore the different possibilities for the heart, as a tissue, to adapt to changes in the work rate during chronic mechanical overload, that is, overload due to chronic hypertension, valvular or congenital diseases, and to the fibrous scar of a myocardial infarction. Clinical or experimental cardiomyopathies (i.e., cardiac hypertrophy of unknown origin), cardiothyreoses, cardiopathy due to intoxication, infection, hypocalcemia, as well as hypertrophy due to exercise or any other type of cardiac hypertrophy of a nonmechanical origin have been excluded from this study. Several reviews have already been published on this topic (17,50,62,79,108,188,222).

EXPERIMENTAL MODELS

We restricted this section to models routinely used by biology laboratories. Some of their characteristics may, in fact, explain several contradictions developed below (review in 227). The choice of an appropriate model is difficult, and depends mainly on the aim of the work to be carried out.

Acute or progressive loading. In order to mimic a clinical situation, such as chronic arterial hypertension or arterial stenosis, progressive overload induced by an Ameroid clip (235) or a Jacobson cuff (19) is required. The main argument in favor of the latter techniques is that abrupt overload produces severe degenerative changes (18,39). In fact, such alterations were observed in Goldblatt rats, and we do not yet know whether they are the result of a specific vasculopathy (119,264); they were absent, however, after acute perforation of a sigmoid cusp producing aortic incompetence (98).

Mild or severe hypertrophy. For experimental work, it is important to obtain a bulky hypertrophic heart in order to amplify the results and to mimic the human situation. It is often difficult to wait 1 or 2 years for several reasons, one of them being the technical difficulties of performing several biochemical studies on an aged heart.

Failure. As already explained, there has been some confusion regarding this point, and it is important to again emphasize that failure occurring after a long period of chronic overload on a hypertrophic heart is fundamentally different from failure occurring either immediately after a severe aortic stricture or in experimental hereditary cardiomyopathy, bacterial endocarditis, or cobalt poisoning. Models of chronic failure have been extremely rare, poorly reproducible, and this evolution is often a chance-occurrence in experiments rather than a systematic one.

Volume or pressure overload. This problem is not experimentally resolved, since, in models such as aortic insufficiency, aorto-caval fistulae, or atrial septal defect, the pressure component was rarely absent and probably became more and more predominant with time. The only pure volume overload model, mitral insufficiency, is extremely difficult to control in chronic experiments.

Models in the Rat

Despite the abnormalities in rat heart physiology, such models are extremely popular because of their low cost. The technique of abdominal aortic stricture

initially proposed by Beznak (15) was greatly improved by Cutilletta (43,184,247) using a modified Hemoclip. Reproducible hypertrophy and survival rate were only obtained if the diameter of the clip was routinely checked on a microscope. It was experimentally shown that 200 g rats did not survive if the surface of the ring was smaller than 0.50 mm^2 and that there was no hypertrophy above 0.70 mm^2 (203). This roughly corresponds to an arterial pressure of 180 mm Hg, and increases heart weight up to 30 to 50%. In this model, hypertrophy began after 3 to 4 days and reached a plateau by the end of the first week. In one case out of ten, there was hypertrophy of up to 80%. These hearts never failed. The technique was improved by using thoracic stenosis (243), which nevertheless prolongs the duration of the operation.

Aortic incompetence was developed by P. Hatt (98,121). Insufficiency was produced by forcing a catheter through one leaflet. It increased pulse pressure by 30% and the degree of hypertrophy reached a plateau of +40% by the third week. Again failure did not occur, even after 1 year. Perforation of a second leaflet killed most of the animals within several days. As in the case of stenosis, it was not unusual to obtain a doubling of heart weight occasionally.

Experimental hypertension can be produced by several interventions, among them that of Goldblatt, which results in 30 to 50% hypertrophy within 4 weeks (119). The spontaneously hypertensive rat strain (168) was also extensively studied as a model for chronic heart overload, in spite of serious limitations, since: (a) the heart hypertrophies before the elevation of blood pressure (228); (b) reversal of hypertension was not always associated with reversal of hypertrophy, depending on the hypotensive drug used (262); (c) in the Kyoto Wistar strain, which is the usual control strain for the Okamoto rats, there is an abnormal proportion of biventricular hypertrophy which does not exist in the common Wistar strain (195); (d) an antiserum against the nerve-growth factor was effective against hypertension, but did not modify hypertrophy (41). The hypertrophy usually reaches +60% after 3 to 6 months, but one of the main characteristics of this model was its tolerance, since heart failure was observed after 1½ years and a significant reduction in contractile performance was observed only after 40 weeks (168).

The two-step mechanical overload proposed by Jouannot (121) was the best compromise between the need for obtaining very extensive hypertrophy, and that of working in a relatively short period with rather young animals. An aortic insufficiency was induced 2 weeks after an abdominal aortic stricture performed on 200 g rats. Two months later, the animals generally began to die of heart failure, and most of the hearts reached 80 to 120% hypertrophy.

A coronary stenosis by a single ligation was difficult to produce in rats, since the artery was sunken into the myocardium. When a chronic infarction was needed the survival rates, even in experienced hands, never reached more than 30% after a few days. The production of a scar was rapid and, soon after, the left ventricle hypertrophied (49,173). Chronic heart failure was extremely rare.

The production of an aorto-caval fistula was rather difficult from a technical point of view, and microsurgical instruments and a stereomicroscope (70,99,173,176)

were required. Nevertheless, this is the best model available for producing volume overload. The development of hypertrophy was slow, but usually reached +100% after several months (145,175). The heart rarely failed and few degenerative changes were noted (99).

Other Models

The rabbit was less frequently used. All the techniques described for the rat have also been published on the rabbit (review in 145). Compared to the rat, aortic incompetence was more easily produced, and required one year's time to induce failure. Abdominal aortic stricture was abandoned because of the rapid development of a compensatory collateral circulation which is characteristic of this species. Pulmonary artery stenosis in rabbits was routinely used by N. Albert's laboratory. A spiral monel metal constrictor allowed very precise control of the stricture. When studies were performed within 4–6 weeks after banding (5,94), this model was a typical model for compensatory hypertrophy.

Pulmonary artery stenosis in the cat was one of the most extensively studied models. It was rather well standardized and by controlling the degree of stricture, allowed the choice between a subacute model of heart failure and a chronic model for compensatory hypertrophy (237).

In the guinea pig, the thoracic aortic stenosis model usually produced subacute heart failure (77) possibly due to the well-known fragility of this animal. Other models were proposed in swine (263).

The induction of hypertrophy by an experimentally induced atrial-ventricular block (274) was of particular interest. More recently, it has been proposed that aging may be used as a model for overload, since aging is associated with an increased peripheral resistance (132,277).

Biochemistry has been studied in humans both on autopsy (17,144) and on biopsy samples (191,192). It is highly probable that several biochemical components, such as myofibrils, for example, are unmodified by autolysis. In order to study small biopsies, microtechniques (192) are usually required.

Degree of Hypertrophy

The degree of hypertrophy was usually estimated either by measuring the heart weight/body weight ratio, or by subtracting the theoretical weight from the observed weight, using the equation which defines the normal relationship between heart and body weight. It was shown (84,247) that the heart-to-body weight ratio was not linear when plotted against age or body weight; in the adult, the regression curve heart/body weight was linear and allowed a better estimation of hypertrophy. The normal theoretical heart weight of a rat could be calculated as follows (84,247,248):

$$\text{Ventricular weight in mg} = (2.02 \times \text{body weight in g}) + 197$$

The same equation in the rabbit was:

$$\text{Ventricular weight in g} = (1.90 \times \text{body weight in kg}) - 0.36$$

The percentage of hypertrophy was, therefore:

$$\text{hypertrophy in } \% = \frac{\text{observed} - \text{theoretical ventricular weight}}{\text{theoretical ventricular weight}} \times 100$$

Conclusion

A critical evaluation of the experimental models used for producing cardiac hypertrophy must be based upon four criteria: rapidity of producing an overload, importance of the degree of hypertrophy, percentage of failure, and duration of the period of compensatory hypertrophy and pressure or volume + pressure overload.

THE SARCOMERE

A great deal of research has been carried out at the sarcomere level, and qualitative modifications in myocardial structure have been found to be predominant. Moreover, the existence of a good correlation between physiological and biochemical data, already shown in phylogeny, seems to be more and more evident.

Physiological Data

It is not our purpose in this review to fill in the gap existing between clinical and experimental results concerning the measurements of cardiac contractile performance (see review in 24,257); rather, we shall summarize basic features, especially those which have been correlated with biochemistry.

Sonnenblick (234) was the first to show clearly that the fundamental properties of skeletal muscle may apply to the myocardium, providing that one uses an appropriate fragment of the heart whose fibers are mainly parallel. The technique of papillary muscle has been extensively employed, mainly in the cat and more recently in the rat. It allows an estimate of the maximal speed of shortening (V_{max}) observed when the muscle is unloaded. The validity of V_{max} as a contractile index is controversial (257) and it appears that this measure was extremely difficult to perform on an intact heart *in vivo*. More recently, in his zero-load clamp technique, Brutsaert proposed measuring the unloading shortening velocity on papillary muscle, by an abrupt modification of the load (24,25,142).

Normal heart function can be defined by two different curves: the force velocity curve which relates the speed of shortening to various loads (after-loaded isotonic contractions) (Fig. 1) and the force-length curve obtained by plotting the active force developed by isometric contractions for different initial lengths in isometry (24,234).

The general opinion was that during pressure overload (i.e., mainly after abrupt or progressive pulmonary artery stenosis in cats and aortic striction in rats) there was a progressive decline in the maximum speed of shortening (estimated by extrapolation to zero load measured at the lightest load possible) which increased the time to peak tension (see ref. 39 for discussion).

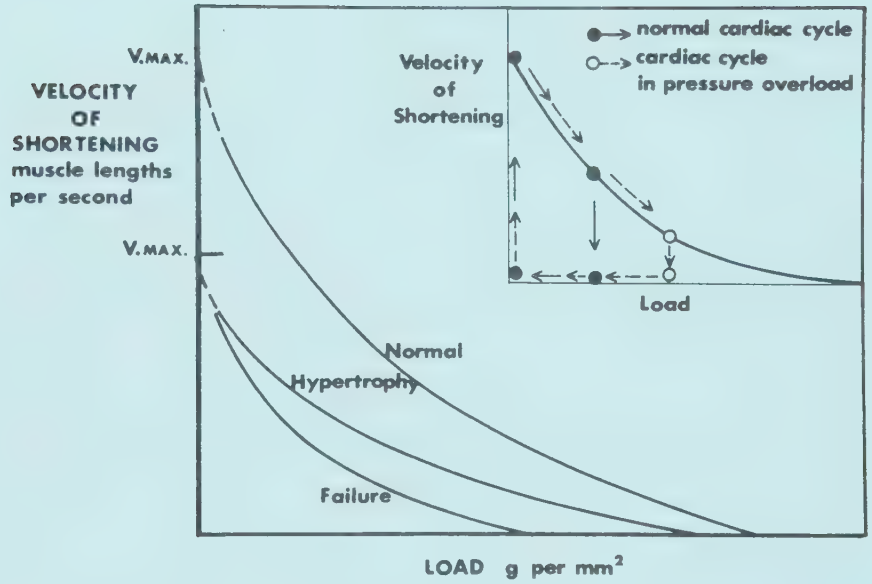


FIG. 1. Force-velocity relation observed on a normal papillary muscle preparation and with a muscle taken from overloaded heart either with a compensatory hypertrophy, or in failure. In box, the course of a normal cardiac cycle and of the cardiac cycle immediately after an elevation in afterload (pressure overload). This scheme was rearranged from data from Chandler (31), Spann (238), Hamrell (94), and Sonnenblick (234).

The maximum force developed in isometry at the best initial length was usually normal during a long period and began to decline when failure occurred (16,94). These alterations cannot be explained by hypoxia, nor by the increased amount of fibrosis (16), and have also been reported on glycerinated or skinned fibers, that is, muscles whose sarcolemma was more or less destroyed and became permeable to ATP and ions (104,119,167). Data observed on papillary muscle correlate with those reported on the entire heart *in situ* (238). They were reversible either by suppressing the stenosis or by a treatment with digitalis, and the rapidity of a return to a normal situation was inversely proportional to the duration of overloading (27,28,35,38,44,122). The participation of fibrosis was critical, and could impair a total recovery of the maximum rise in tension (16,131). Finally, myothermal measurements showed an improvement in efficiency, since, for the same tension, the heat production in the hypertrophic heart was lowered (5).

Nevertheless, several papers contradict the above-mentioned concept. Williams (270) found a reduced speed of shortening soon after the production of a stenosis, by the 24th week. Similar findings were reported by others (69,122,190). In fact, as suggested by Cooper (39), the above experiments were performed during the chronic stage on papillary muscles which were too large and, occasionally, at temperatures which were too high to allow good oxygenation of the preparation. This method is not entirely satisfactory, but, to date, it may be the best explanation for such an unexpected biphasic evolution in contractility.

Up until now, normal performances have been reported in papillary muscles prepared from volume overloaded hearts, such as those obtained in cats after an atrial septal defect (29,37). In the same model, hemodynamic studies have usually concluded that such an overload is mainly compensated for by the increase in mass (206,207), the norepinephrine stores (70), and the cardiac dilatation (152,207). Nevertheless, this point has not yet been resolved, because a significant reduction in contractility was found in other models (196). Biochemical data were also in favor of such an alteration (see below). The main problem lies in the evolution of the pressure component of a volume overload, especially in aortic insufficiency.

Studies on humans have raised other controversies. The only two studies performed on papillary muscles excised during interventions have clearly shown a reduced V_{max} in chronic hypertrophy (32,245). Hemodynamic data have been extremely numerous and often controversial. The two most recent papers from Krayenbuhl (110) and Grossmann (87) measured velocity in relation to wall stress in aortic stenosis. A significant reduction in contractility which parallels the degree of hypertrophy has been observed in the largest of these two series (76 patients in ref. 110), and it is possible that the study which shows normal contractility was too limited (16 patients in ref. 87) to exclude fortuitous results.

Contractile Proteins

Since the pioneer work of Galeone (74) this problem was simplified and partially resolved by the discovery of heavy chain myosin isozymes in the heart (107,210) and evidence of a myosin isozyme redistribution in cardiac overload (160). Several reviews have already been published on normal (147) and pathological modifications (211,251,267) in these proteins; they have facilitated our task and have permitted us to discard earlier references and to restrict the review to more recent or major ones.

Normal Cardiac Sarcomeres

Normal cardiac sarcomere was very similar to the skeletal sarcomere under the electron microscope and the contractile process was basically identical in these two muscles. Clear-cut differences in protein structure exist between these two muscles, and from one species to another. Those which concern myosin and troponin C are closely related to muscle function.

The shortening of the cardiac sarcomere was a consequence of the sliding of two filaments: a thin one, mainly composed of actin, troponin, and tropomyosin, and a thick filament made up of myosin. This sliding was monitored by a movement of the myosin head on actin. This portion of myosin was also able to hydrolyze ATP, and its ATPase specific activity correlates linearly with the maximal speed of shortening of unloaded muscles in phylogeny in the skeletal, as well as in the cardiac muscle (Fig. 2) (10,48,201). Immunochemical studies have confirmed these enzymatic data (225). Generally, the ATPase of cardiac myosin was lower than

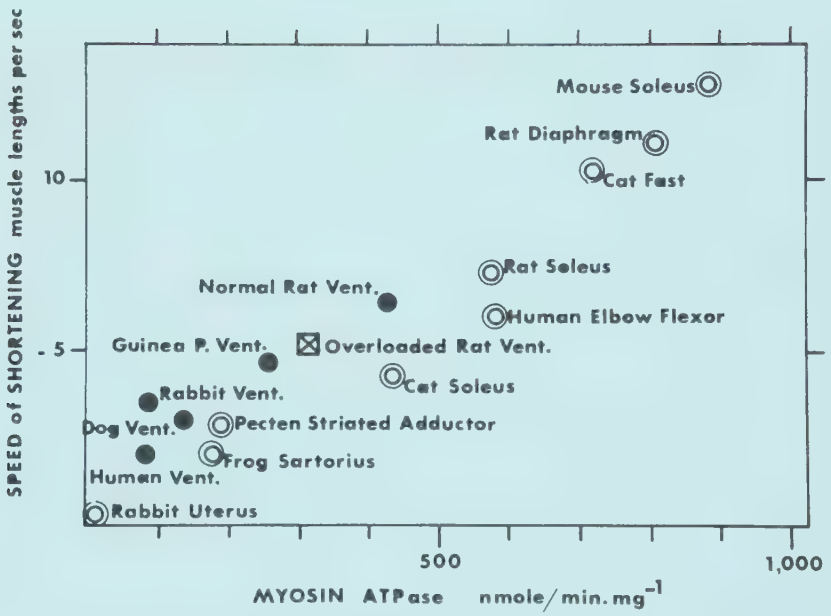


FIG. 2. Correlation between the maximum speed of shortening and the specific activity of myosin Ca^{2+}-activated ATPase. Redrawn from data published by Barany (10) ○, by Delcayre (48) ●, and from data obtained in our laboratory ⊠.

that of skeletal muscle; however, this is not a general rule and slow skeletal muscle, for example, may have a lower activity than fast cardiac myosin from a rat.

The activation of the sliding was a consequence of the binding of Ca^{2+} to troponin C, an 18,000 MW molecule located on the thin filament, which in turn prevented troponin I—another thin filament component of MW 23,000— from exerting an inhibitory effect on the actin-myosin head binding.

The two troponins showed certain differences in the heart (11,40), the main difference being that troponin C bound three Ca^{2+} instead of four in the skeletal muscle.

Recently, attention has been focused around a phosphorylation regulatory process, which is predominant in smooth muscle. Cardiac troponin I is unique in that it may be phosphorylated by a cAMP kinase and that the amount of Pi bound is directly proportional to the force (53,135). In addition, another mechanism has been reported for myosin whose light subunit may be phosphorylated by a calmodulin-dependent kinase. The physiological role of these two mechanisms remains extremely controversial.

Myosin ATPase in Chronic Overloading

More than 50 publications (reviewed in 251) have how reported a significant reduction in myofibril, actomyosin, or myosin ATPase in chronic pressure overload due to pulmonary artery stenosis in cats (31), dogs (47,230), or rabbits (159), aortic stenosis in rabbits (171) or rats (11), chronic arterial hypertension in Goldblatt rats (119) or in the Okamoto strain (168), after a chemical sympathectomy (51) in models of volume overload such as aortic incompetence in rats (11) or rabbits (248,250), and also in humans on autopsy and biopsy samples (144,191), but not after an atrial septal defect in cats (29).

The enzymatic activity was usually depressed by 30 to 40%. The defect was localized on myosin and not on some other myofibrillar components, and was also observed when the myosin head was separated from its tail by tryptic hydrolysis (159). Ca^{2+} and Mg^{2+}-actin activated activity were usually depressed more than K^{+}-EDTA ATPase, which was unmodified. These selective modifications were very similar to those observed in phylogeny (276) (Fig. 2). It has been suggested that this enzymatic defect was the result of a denaturation of the molecule. This has been ruled out by showing that myosin from both normal and hypertrophic hearts has the same phosphate burst size, that is, that these two preparations were able to hydrolyze 1.6 to 1.8 mole ATP per mole of myosin (138,160).

When plotted against both the degree of hypertrophy (11,144) and the maximum speed of shortening (31,119), a significant and positive correlation was observed. The larger the heart, the lower the ATPase. Nevertheless, as in the case of mechanical properties, it has been observed that the appearance of peripheral signs of failure was not directly related to the enzymatic activity. Thermal measurements on papillary muscle permit the estimation of tension- and therefore of myosin ATPase-dependent heat and have shown that the low ATPase accounts for the decrease in the tension-dependent heat (5).

From a pure biochemical point of view, such an alteration can only be due to a change in myosin structure. Although the MW of the myosin subunits was unmodified (250), it has clearly been shown that the myosin heavy chain structure was changed, that this modification was responsible for the depressed ATPase, and that this was due to a myosin heavy chain isoenzyme redistribution.

Myosin Isoenzyme Redistribution in Chronic Overloading

Myosin isoenzymes can be easily differentiated in slow or fast skeletal muscle, not only by their ATPase, but also, and mainly, by their light subunits whose MW, amino acid composition, and immunochemical reactivity differ. Atrial myosin ATPase is higher than ventricular myosin ATPase in mammals, which is to be expected in a muscle which contracts faster (252). Differences also exist in the light subunits (252) and in immunochemical properties (160,210). The heterogeneity of ventricular myosin was first demonstrated on a special nondissociating pyrophosphate gel electrophoresis which allows the myosin, a water insoluble protein, to migrate (107). In the adult rat, ventricular myosin was made up of three isoenzymes, V3,

V2, and V1, whose specific ATPase activity was on the order of V3 < V2 < V1, and whose proportions were V3 < V2 < V1. V3 was predominant in the fetus and V1 in the adult (161). These isoenzymes had specific antigenic structures and were able to be differentiated by peptide mapping.

In chronic overloading in rats, there is a redistribution of these isoenzymes whose proportions became V3 = V2 = V1 in mild hypertrophy, and V3 > V2 > V1 in bulky hearts, as for example in the two-step overloading model described above (160) (Fig. 3). This distribution explains the enzymatic changes; the increasing amount of V3, with its low ATPase activity, correlates with the decrease in the whole myosin ATPase. Such a change in rats was found whatever the model of pressure overloading, and was also found in aortic insufficiency, and thus correlates with heart weight. It also occurred after an aorto-caval fistula, but was delayed and did not correlate with heart weight (173). Moreover, the isozymic changes were related to the maximal speed of shortening measured by the zero-load clamp technique (25) on a papillary muscle (unpublished data from our laboratory). This has been confirmed by immunochemical studies (226) and by finger prints (132).

This finding clearly explains what occurs in rats. Only one isozyme can be found in cardiac myosin extracted from bigger animals such as dogs, or from humans,

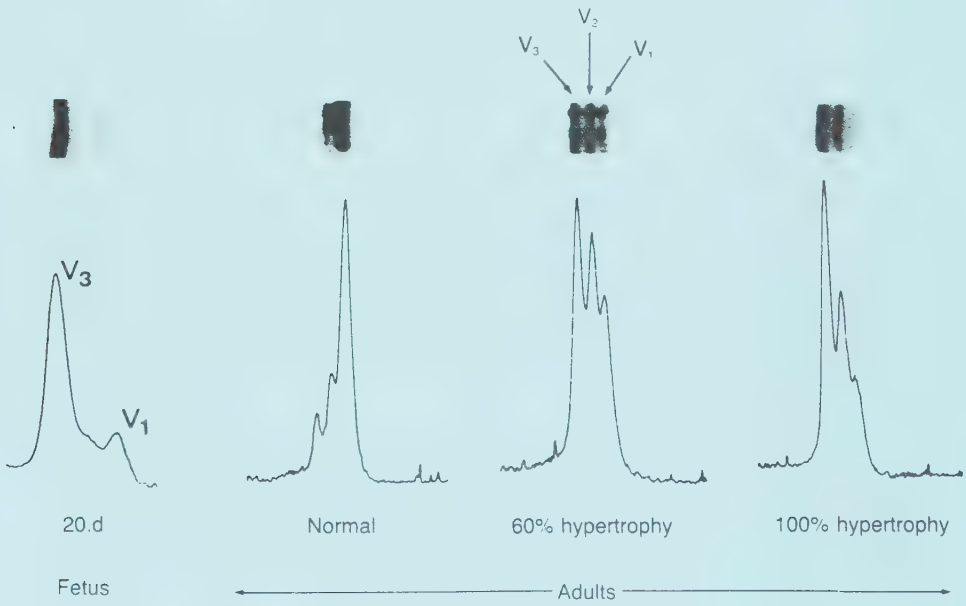


FIG. 3. Ventricular myosin isoenzymic redistribution in cardiac overload in rats. Pyrophosphate gel electrophoresis showing the three myosin isozymes. The fetal (on the left) predominant isozyme V3 reappears in chronic overload. 60% hypertrophy = 1 month after aortic stenosis. 100% hypertrophy = 2 months after aortic stenosis + incompetence, see Fig. 1 (from A. M. Lompré et al. (160), reprinted by permission from *Nature* © 1979 Macmillan Journals Ltd.).

and it is therefore not possible to show that such a process may occur in these species. It is highly probable that other isoenzymes which may not separate on a pyrophosphate gel do exist in these species, and this was suggested by finger printing analysis; to date, however, this has not been proven.

The predominance of the V3 form during overloading in rats corresponded to the reappearance of the fetal type isoenzyme. Species such as rabbits were characterized by the persistence of V3 during adult life, thus making impossible an isozymic redistribution in favor of the low ATPase form. Thyrotoxicosis, which increased myosin ATPase in rabbits, also induced a corresponding redistribution in favor of V1, whose amount was enhanced parallel to ATPase. Chronic overloading eliminated the small amounts of normally existing V1 from the gel, but this does not satisfactorily explain the dramatic decrease in ATPase observed under these conditions. Therefore, the major problem in other species is either to demonstrate the heterogeneity of the isoenzymes already shown on pyrophosphate gel (in species other than the rat) or to find another mechanism, such as phosphorylation for explaining the reduced ATPase.

Other Proteins

Although phylogeny (12,146) has suggested possible adaptational modifications of the thin filament proteins, the few papers which have appeared on this subject have shown no changes in the troponin system (11,119).

Conclusion

There is no longer any doubt that chronic overload, at least in rats, induces a myosin heavy chain isoenzyme redistribution which favors the low ATPase forms, can explain the decreased activity reported by several authors, and probably accounts for the drop in the maximal speed of shortening. This mechanical modification was adaptational, since heat production was depressed and therefore energy metabolism improved.

THE SARCOLEMMA

Reports from several laboratories have now clearly shown a broadening of the action potential coupled with a slowing down of the shortening speed in chronic hypertrophy. These physiological data are well documented; in contrast, biochemical findings are poor, rather outdated, and extremely controversial.

Physiological Data

The first studies of action potential were performed on cat papillary muscle made hypertrophic by chronic pulmonary artery stenosis, and combined mechanical and electrophysiological measurements. Gelband (76) was the first to show a rather large increase in action potential duration (for 100% repolarization from 246 to 302 msec). A rough correlation with mechanical performances was also found. These

modifications were rather discrete and difficult to demonstrate (probably because of the shape of the normal cardiac action potential in cats) and were not shown by Kaufmann (128). Other authors (109,254) have confirmed Gelband's initial work on the same model.

In the rat, the action potential was unique in its sharpness and this is probably why the increase in duration was so evident in the initial work published by Gülch (91) in the Goldblatt rat (Fig. 4). Such a broad action potential was associated with high chronic load even in normal rats, since the left ventricular potential was broader than the right one. It also existed in guinea pigs and cats. Similar findings were reported by Aronson (8) in rats made hypertensive by renal intervention.

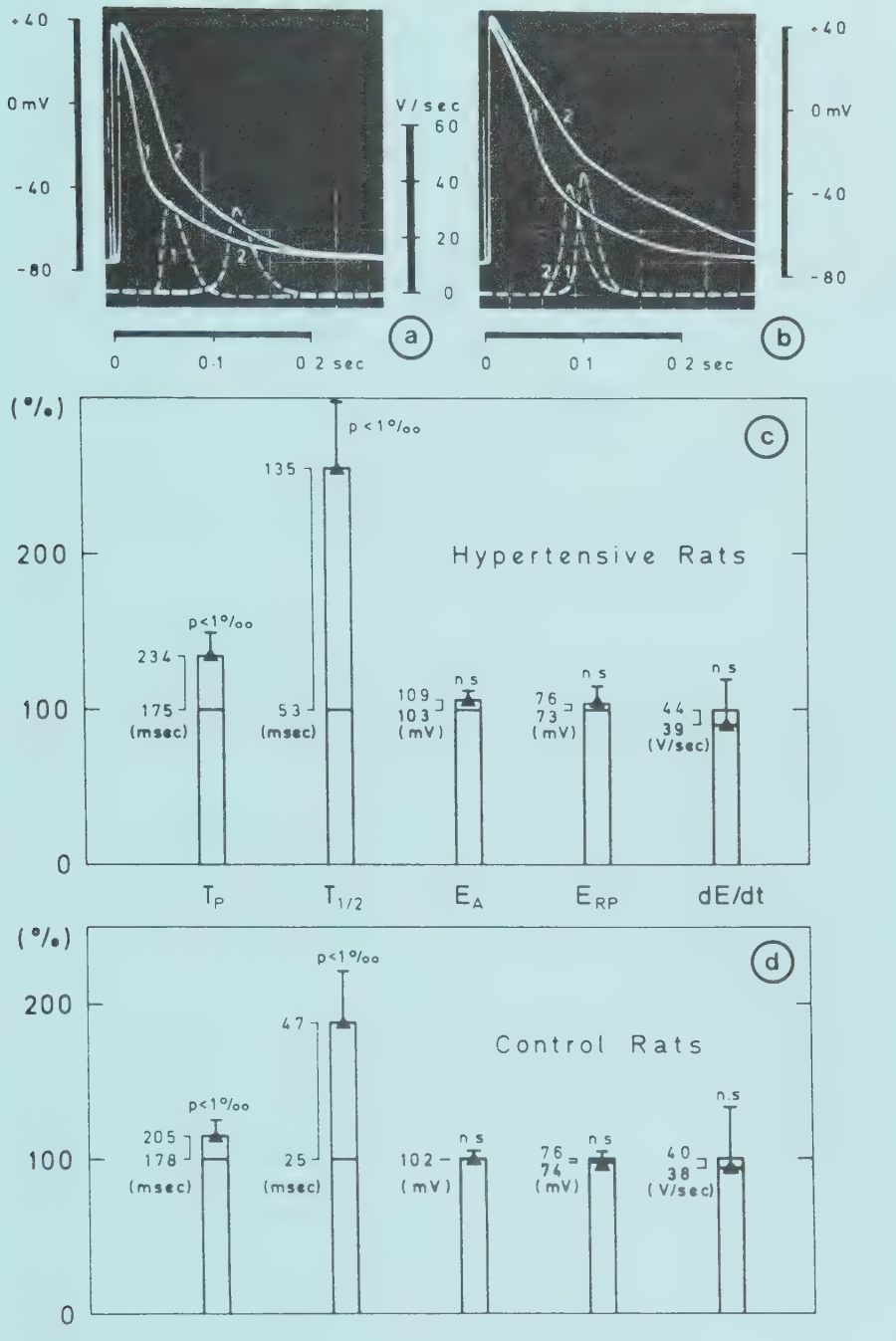
Although no studies have yet been performed involving the sucrose-gap techniques, we already have some indications concerning the pathogenesis of this defect by means of ion changes or metabolic inhibitors. The increase in duration was, in fact, unmodified when phase 1 was suppressed by tetrodotoxine (TTX) or when a partial depolarization was obtained by a high extracellular K^+. Both high extracellular Ca^{2+} or low Na^+ induced a shortening of the action potential which was more pronounced in the hypertrophied heart. Under high Ca^{2+} conditions, the potential duration to 50% of complete repolarization shortened from 15 to 12 msec in controls and from 42 to 20 msec in hypertrophy (8,91). This suggested a slowed inactivation of the Ca^{2+} -inactivated inward current (8) or at least a defect in the slow inward current (91).

Alterations in resting potential have been reported recently in cat hypertrophied right ventricles (109). A rewarming of the cooled preparation and a transient period of rapid stimulation both induced a slight but definite hyperpolarization of the diastolic potential, which was less pronounced in the hypertrophied papillary muscle. These data were extremely suggestive of an altered electrogenic Na-K pump due to a modification in the Na-K-ATPase itself or, to a change in its ionic, lipidic, or proteic environment.

Biochemical Modifications

The normal sarcolemma is not as yet very well known and recent developments in membrane biochemistry concerning phosphoproteins, membrane fluidity, and the right side/inside out vesicles have not yet been applied to the heart, nor, of course, to the hypertrophied heart. Some of these discoveries are of such importance

FIG. 4. The action potential (AP) in chronic heart overload **(a)** AP from right (1) and left (2) ventricle of a normal rat. Dashed traces: first-time derivative at tenfold sweep. **(b)** Same as in **(a)** on the hypertrophied ventricle from a Goldblatt rat. **(c),(d)** Statistical analysis of above data. The data registered on the left ventricle have been normalized according to those from the right ventricle. Therefore, for each column the 100% bar represents the right ventricle value. The numbers in msec, mV or V/sec represent the absolute values. T_p, isometric peak time, $T_{1/2}$, halfwidth of the AP; E_A, AP amplitude; E_{RP}, resting potential; dE/dt, maximum upstroke velocity. Note both a lowering of mechanical activity, as indicated by the enhanced T_p in **(c)** and of the AP, as indicated by the increase of $T_{1/2}$ in **(c)** (from R. W. Gulch (91), reprinted by permission from *Basic Res. Cardiol.* (1980), 25:23–80. Steinkopff Verlag).


+40
0 mV
-40
-80
V/sec
60
40
20
0
0 0.1 0.2 sec
a
b
(%)
200
100
0
c
Hypertensive Rats
p<1°/oo
135
234
175
(msec)
53
(msec)
109
103
(mV)
76
73
(mV)
44
39
(V/sec)
n.s
T_P
$T_{1/2}$
E_A
E_{RP}
dE/dt
d
Control Rats
47
205
178
25
102
76
74
40
38

ARTICLE 6

that we predict a profound change in this field in the near future. As described above for the sarcomere, the problem is to find out whether there is any biochemical counterpart for the physiological data (i.e., the lengthening of the action potential).

Morphological studies on pure overload have shown an increase in the size of myocytes and, therefore, of the surface area of the sarcolemma, which was associated with projections responsible for a multiplication of the intercalated discs (3,68).

The preparation of cardiac sarcolemma requires special care as compared to the routine techniques for erythrocytes, for example. This is due to its high mitochondria content and also to the presence of membrane-bound myofibrils. Several washes with high ionic strength KI or KCl (241) and solubilization with detergent were frequently proposed (67,165), although they possess a somewhat denaturing effect on some membrane enzymes (120,130). A comparative study of three procedures used to prepare sarcolemma has been performed (164).

The most important enzyme in the sarcolemma is the Mg-Na-K-ATPase which extrudes the Na^+ from the sarcoplasm in order to maintain the myocyte in a depolarized state. This enzyme was universally present (125,223,239) and has two sites, an outside and an inside site; the first site binds ouabain, and the second is able to hydrolyze ATP. This enzyme was specifically inhibited by ouabain and it is generally accepted that this inhibition, which increases the intracellular Na^+ reduces the Na^+ gradient and consequently the two Na^+-one Ca^{2+} electroneutral exchange. It therefore increases contractility by increasing intracellular Ca^{2+}. It was hypothesized by Khatter and Prasad (129) that in hypertrophy, an enhancement of the Mg-Na-K ATPase activity would depress contractility by a mechanism opposite that proposed for the inotropic effect of ouabain.

Several papers have studied this enzyme in hypertrophied hearts. Their results were highly conflicting, since enzymic activity was found to be either increased (129,200), normal (80,81,109,154,169,249), or decreased (139,275). All these papers report a low specific activity (between 0.07 and 0.46 μmol P/min mg^{-1}), especially when compared to that reported for pure enzyme (between 11 and 116 μmol P/min mg^{-1}, see ref. 239); more recent papers have reported a better activity of around 2 μmol P/min mg^{-1} (148,154).

Methodological problems must be solved before pursuing such a subject. For example, (a) data suggest that this enzyme could exist in isoform; (b) the Na-K ATPase concentration may vary according to the pathological situation, at least in erythrocytes (55); (c) membrane fragments spontaneously roll up to make right-side or inside out vesicles hiding either the ouabain binding site or the ATPase active site (148); (d) the protein and lipid composition of sarcolemma varies according to the isolation procedures, and it is now accepted that the enzyme activity can be modulated by phosphoproteins as well as by lipoproteins (64,260).

The sarcolemma was made up of other enzymes, including a Ca^{2+}-pumping ATPase likely to extrude Ca^{2+} from the cell (30,50), and which is a good candidate for explaining the electrophysiological data (50). Although several papers have been published on various models of cardiomyopathy, especially in Dhalla's laboratory

(50), we still have no information on pure overload. The Mg^{2+}-ATPase and the 5′ nucleotidase were found to be normal (81,139,154,192,249).

Few studies have been concerned with membrane receptors. Limas (153,154) has reported two conflicting results. He showed a reduced number of cardiac beta-adrenergic receptors, as reflected in specific (^{3}H)dihydroalprenolol binding, in the myocardium of 5- to 30-week-old spontaneously hypertensive rats, and an increased number of the same receptors in the hypertrophied hearts after aortic stenosis. The latter was attributed to a defect in the activity of a sarcolemmal methyl transferase (155).

Conclusion

A lengthening of the action potential in chronic overload seems to be a well-established fact which correlates with the slowing down in the velocity of contraction, and which also represents a true adaptational factor. A slight alteration in the resting potential has also been shown. In contrast, the most recent techniques for biochemical studies of the sarcolemma have not been applied to this model, and up to now the data which have been reported concerning the Mg-Na-K ATPase are extremely controversial.

CALCIUM MOVEMENTS AND THE SARCOPLASMIC RETICULUM

Although no reports have been published on Ca^{2+} movements in chronic hypertrophy, we feel it necessary to summarize briefly the main ideas found in the literature concerning normal hearts. This will enable us to better understand the alterations observed in sarcoplasmic reticulum and to try to correlate mechanical and electrophysiological data.

Calcium Movements in Normal Heart

When compared to skeletal muscle, the heart is unique, since it is unable to develop force in a Ca^{2+}-free medium (Fig. 5, reviews in 60,82,126,127,185,271). Each contraction is dependent upon the external (Ca^{2+}), but the relationship between those two "partners" is far from simple.

The external Ca^{2+} binds to the surface membrane glycoproteins (= glycocalyx) before entering the cell during the plateau of action potential. 0.5 to 2.7 nmol of Ca^{2+} per g of tissue reaches the sarcoplasm, and it has been clearly shown that this amount is not sufficient to activate contraction, possibly because one part is immediately bound to Ca^{2+}-binding proteins such as calmodulin. In fact, the Ca^{2+} which both triggers and maintains contraction is liberated by the sarcoplasmic reticulum by means of an autocatalytic phenomenon called the Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release (60). As little as $5 \times 10^{-8} M$ Ca^{2+} is able to release 10 to 100 times more Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum stores (0.2 to 0.6 μmol/g) and, therefore, to fully activate the contraction (which needs 10^{-7} to 10^{-5} *M* Ca^{2+}). At the sarcomere level, the Ca^{2+} binds troponin C, inhibits the troponin I, and then allows

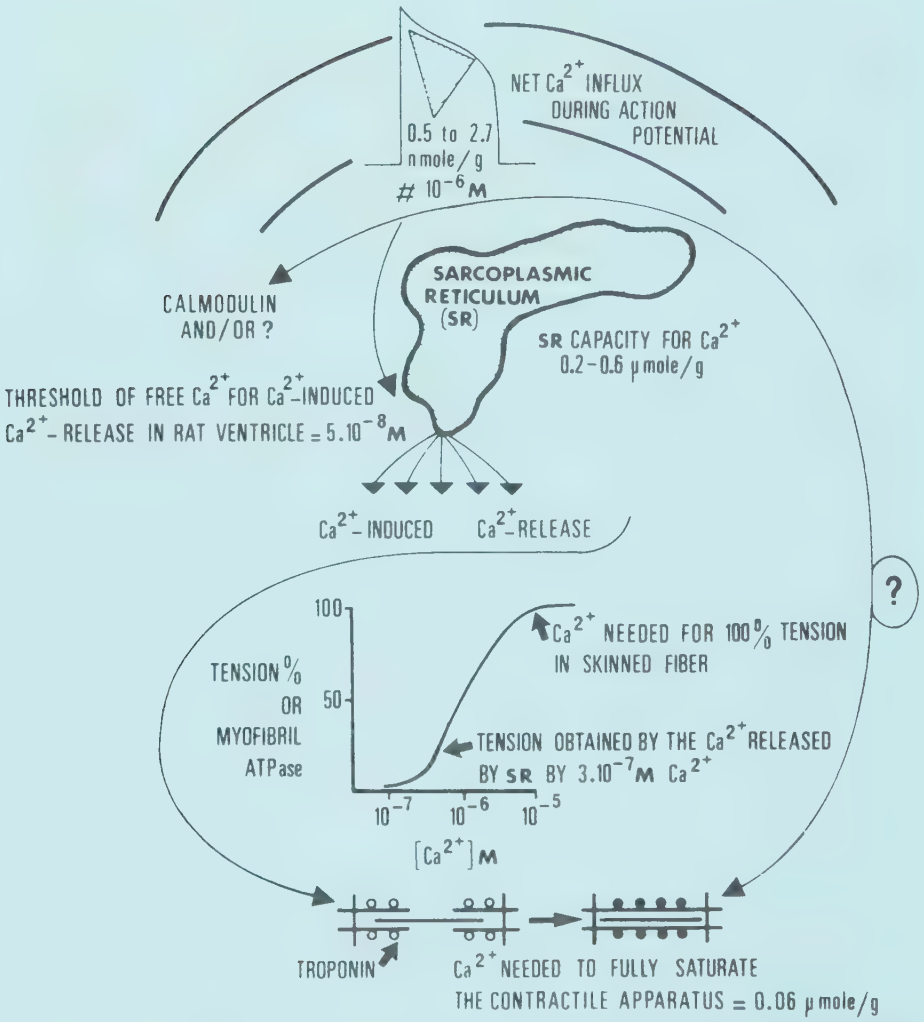


FIG. 5. Ca^{2+} movements in normal heart. Most of the Ca^{2+} influx during the action potential was bound by proteins, perhaps calmodulin. A small amount releases Ca^{2+} stores from the sarcoplasmic reticulum and then activates contraction at the troponin level. Rearranged using data from Winegrad (271), Braunwald (22), and Fabiato (60).

the thin and thick filament proteins to react. The relaxation is due to the pumping ability of the sarcoplasmic reticulum, which is able to concentrate Ca^{2+} against the gradient by means of an ATP-dependent calcium pump, MW 100,000, which utilizes 1 ATP for 2 moles of Ca^{2+} (124,127). This system may be controlled by phospholamban (150,268), by lipids, (127) and by cAMP (54).

Several data suggest that this system may adapt itself to mechanical requirements. For example: (a) the threshold of free Ca^{2+} for Ca^{2+}-induced release of Ca^{2+} from

the sarcoplasmic reticulum increased among the ventricular mammalian tissue in the following order: rat < pig, cat < human (60), inversely correlated with the myosin ATPase and the shortening speed; (b) fast kinetic properties of the Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum showed differences between muscles with different speeds of shortening which could be due to different isozymes (96,261).

An outflow of Ca^{2+} exists, although it has not been thoroughly explored. The Na^{+}-Ca^{2+} exchange may extrude one Ca^{2+} for two Na^{+}, providing the Na-K pump is functioning. More recently, a sarcolemmal Ca^{2+}-ATPase, able to extrude Ca^{2+} from the cell against the gradient, was reported (30,50).

Chronic Overload

It is reasonable to hypothesize that in a situation such as chronic overload, the slowing down of the shortening velocity and the broadening of the action potential must at least be accompanied by less active Ca^{2+} movements across the cell. Indirect evidence for such a defect was brought out by thermal measurements, but physiological studies on this subject remain inconclusive compared to biochemistry.

Physiological Studies

Rapid myothermal methods were coupled with mechanical measurements on papillary muscles made hypertrophic by pulmonary artery stenosis in rabbits. With these techniques, the initial heat production could be partitioned into a tension-dependent and a tension-independent portion. The latter was obtained by measuring the heat output when tension was eliminated by circulating the muscle in hyperosmotic mannitol-Krebs solution. It represented the heat produced by the Ca^{2+} transports and was depressed by 54% in chronic hypertrophy (5). This is clearly another adaptational factor since, as detailed above, the same author showed that a hypertrophied heart was able to develop a normal tension with decreased heat production by slowing its speed of contraction (5).

Other data suggest an abnormality in the pumping system during overload. The rat heart is unique in that it responds to an accelerated frequency (from 6 to 60 per min) by decreasing force. It has been shown by Jouannot (122) that this effect was less pronounced 8 days after an aortic stenosis.

Normal relaxation, as shown above, was extremely dependent on the sarcoplasmic reticulum pumping activity. Physiological studies of this period of the contractile cycle were performed in detail by using the zero-load clamp technique in Brutsaert's laboratory (25). In mammalian ventricles the time-course of relaxation was changed by abrupt load alterations, and this load dependence was suppressed by inhibiting the sarcoplasmic reticulum activity with caffeine (143). This load dependence remained unchanged in several models of severely hypertrophied heart, suggesting that either the sarcoplasmic reticulum was normal, or that it was adapted to the new contractile situation.

Biochemistry

The only studies published on this topic dealt with calcium binding, calcium uptake, and the Ca^{2+}-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Sarcoplasmic reticulum preparations spontaneously form vesicles which accumulate Ca^{2+}. In the presence of a precipitating anion, such as oxalate, which maintains a much lower concentration of free Ca^{2+} inside the vesicles, a concentration gradient of more than 1000-fold can be established across the membrane. This property was called Ca^{2+}-uptake as opposed to Ca^{2+}-binding, which was estimated, in a "more physiological manner" (222), in the absence of oxalate. The two initial major findings of Suko (246) and Schwartz (95,96), of a slowing of both Ca^{2+} uptake and Ca^{2+}-activated ATP hydrolysis, have thus been more or less confirmed. The ^{45}Ca uptake measured in the presence of oxalate was decreased by approximately 40% after a chronic hypertrophy induced in calves by pulmonary artery stenosis (246), in rabbits by aortic insufficiency (118), in human, transplanted, failing hearts (96) and in left ventricular failure (149), in sheep after pulmonary artery stenosis (21), and in spontaneously hypertensive rats (102,156). This defect was found at an early stage in the history of cardiac overload, probably before the myosin changes (21,102,156,168) but it was more pronounced in failing than in nonfailing hypertrophic hearts (236,246). In the absence of oxalate, Ca^{2+} uptake rapidly reaches a plateau and must be measured accurately by a rapid kinetic technique such as that proposed by Schwartz (95) using murexide to stain Ca^{2+}. This is probably why Ca^{2+} uptake was normal in hypertrophy for Suko (246) and for Heilmann (102), and depressed for Sordahl (236).

The activity of the Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum, when expressed in moles of P or ATP/min per mg of sarcoplasmic reticulum, decreased after pulmonary stenosis in dogs (169), and calves (246), or in spontaneously hypertensive rats (102). The rate of formation of the phosphoprotein intermediary compound also decreased (102,156) as did the amount of Ca^{2+}-ATPase molecules per vesicle (102). Unfortunately, only one paper studied the important Ca^{2+} release phenomena and found it normal (102). Contradictory data were exceptionally rare: Villani found an increased Ca^{2+} uptake soon after aortic stenosis (259) and Limas reported an increased Ca^{2+}-ATPase activity in spontaneously hypertensive rats (156).

Conclusion

Thermal measurements on papillary muscles as well as biochemical estimations of both Ca^{2+} uptake and Ca^{2+}-ATPase of the sarcoplasmic reticulum have clearly shown lessening of Ca^{2+} movements in the hypertrophied hearts, which is in good agreement with the above mentioned findings on mechanics and membrane potential. Nevertheless, in order to reach a definite conclusion, further studies employing more specific techniques, such as skinned fiber preparations of fast kinetics coupling Ca^{2+} uptake and ATP hydrolysis on sarcoplasmic reticulum are necessary.

ENERGY METABOLISM

Normal myocardial energy metabolism is mainly aerobic, and the glycolytic pathway, so important in anoxic conditions, is of little importance under healthy conditions, even during exercise. The role of either a relative or an absolute anoxia in the pathogenesis of heart failure has been disputed for many years. This classical debate appears out-dated. It is now well established that heart failure may occur without fibrosis, with a normal creatine phosphate content, and a normal myocyte ultrastructure; anoxia constituted an added phenomena which worsened the patient's state but which was not the primary cause of failure. Conversely, as in the other sections of this paper, it is undoubtedly more important to determine precisely how the heart may adapt its energy metabolism to overload. This will allow us to define more clearly the limitations of the process, and therefore, to understand how failure starts.

Oxygen and Substrate Uptake

This was measured *in vivo* by estimating the arteriovenous difference with a catheter in the coronary sinus (17). Under normal conditions, the myocardial oxygen consumption is around 10 ml/min 100 g^{-1} and increased up to 11 or 12 after exercise. This is unchanged in chronic hypertrophy, with or without failure, in human as well as in experimental models, but because of the increased total mass and the increase in systolic wall tension, the total amount of oxygen consumed by the heart is enhanced. The contribution of the myocardium to the oxygen consumed by the body, which is normally around 5%, may increase up to 30% in severe heart failure (17,111,140,151,187).

The substrate uptake in the normal heart varies with diet, exercise, etc., both quantitatively and qualitatively. For example in healthy humans, exercise (bicycle) decreases the myocardial extraction of plasma unesterified fatty acids, mainly because their arterial concentration decreases, and increases the extraction of lactate by increasing (from 7.5 to 65.0 mg%) their arterial level. It follows that, at rest, fatty acids provided 70% of energy as compared to 15% for lactate, whereas after exercise, 3% of energy came from the lipids and 65% from lactate (13). Even taking into account this serious limitation, it seems evident that, at rest, the normal human or canine heart extracts 17% of glucose, 0.5% of pyruvate, 16% of lactate, 67% of fatty acids, 5% of amino acids, and 4% of ketone bodies (66), as expressed in % of oxygen equivalents related to the whole oxygen consumption. This was unchanged in chronic overload, even when expressed in mg% of arteriovenous difference (66,187).

When measured more precisely on experimental models, in cats after pulmonary artery stenosis, and at the same time as mechanical properties on a papillary muscle, oxygen consumption in chronic compensatory hypertrophy was dramatically increased under isometric conditions. For example, when the muscle developed 6 g/mm^2 as a peak isometric tension, the oxygen normally consumed was around 3 $\mu l/mg$ per beat $\times 10^{-3}$ whereas it reached 8 in hypertrophied muscles (36,92).

Similar findings were reported in humans (245). Such observations were extremely difficult to conciliate with the decrease in the shortening speed and, above all, with lowered heat production (5) reported by others in similar models. Indeed, it has recently been reported in the same laboratory (39) that oxygen consumption parallels the speed of shortening and decreases in a model of progressive overload in the same species. Therefore, the enhanced oxygen utilization was attributed to the abrupt character of the overload.

High-Energy Phosphate Compounds

Several papers were published on this subject some years ago. The common opinion at that time was that their levels were normal, and therefore that the overall cardiac metabolism, from an energetic point of view, was well-adapted to overloading. The ATP, ADP, and AMP concentrations were normal in chronic overloading after aortic stenosis in dogs or guinea pigs (26,63), in hypertensive rats (174), after pulmonary artery stenosis in cats (197,198), and even in humans (33). A depressed creatine phosphate level was reported (72,171,174) but, as shown by Pool (197), this could be normalized by leaving the hypertrophied muscle at rest in a well-oxygenated bath for one-half hour (Table 1.) At the end of this period, a normal creatine phosphate level was recovered, whereas the contractile performances of the muscle remained depressed. Therefore, a decrease in this high-energy phosphate compound, when it occurs, cannot explain the mechanical changes.

Mitochondria

Mitochondria adapt to the new situation both by increasing their number and size and by improving their efficiency.

The adaptative growth of cardiac mitochondria after aortic stenosis was reflected in increased incorporation of amino acids as measured both *in vitro* (229) and *in vivo* (4). The stimulation of synthesis occurred soon after overloading, as shown by measuring the incorporation in mitochondria of labeled delta-amino-levulinate, which is a nonreutilizable amino acid specific to the heme group of cytochrome c

TABLE 1. *Experimental heart hypertrophy owing to pulmonary artery stenosis in cats*

	In ventricle just after the sacrifice		In papillary muscle after 30 min in an oxygenated bath	
	Control	Hypertrophy	Control	Hypertrophy
ATP μmol/g	5.34	5.28	5.30	5.95
Creatine phosphate μmol/g	6.78	2.69	7.44	7.52
Maximum force developed in g/mm²	—	—	5.2	1.1

ATP and creatine phosphate level before and after 30 min in an oxygenated bath. The maximum force P_o was measured when the shortening velocity reached zero on the papillary muscle. Data taken from Pool and Seagren (197).

(4). It follows that the myocardial cytochrome c accumulates (202) and that its concentration increases even in humans (45). The mitochondrial mass was later increased by stimulation of mitochondrial deoxyribonucleic acid (DNA) replication. This was associated with the removal of a block in the conversion of DNA D-loops to other intermediates (202).

In electron microscopy, the surface area normally occupied by mitochondria increased although, as discussed below, it is questionable as to whether this increase was proportional to that of the myofibrillar mass. The fragmentation of these organelles which are smaller than normal raises an important question. In a well-defined model of compensatory hypertrophy, the number of mitochondria per square unit was inversely proportional to the mitochondrial average size, and an increased number of mitochondria was usually associated with a decrease in their average size (Fig. 6A) (100). Even with a decreased mitochondria/myofibril ratio, the efficiency of the organelles would be normal or improved, since they multiplied, became smaller, and consequently enlarged their average surface area for oxygen exchanges (100). This is the best explanation for the apparent discrepancy between the variability of the mitochondria/myofibril ratio, which has been reported to be either decreased (186,189,222,224,264,273) or normal (23,98,100,171), and the normal high phosphate energy compounds discussed above. It remains evident that, even in the absence of atherosclerosis, which is the usual associated disease in humans, some models of pressure overload, even mild ones such as the Goldblatt intervention, were associated with myocardial sclerosis, perhaps owing to a decreased intercapillary distance (103).

The physiological functioning of isolated mitochondria can be measured *in vitro*. Normal organelles consume oxygen and phosphate to produce ATP, and a tight coupling exists between the amount of oxygen consumed and the amount of phosphates esterified. This P:O ratio may vary according to the substrate used, but the most important factor which controls the oxygen utilization, at least *in vitro*, is the ADP content. Several states of mitochondrial respiration may then be defined by changing one of the above parameters, and each of them has its physiological counterpart.

Several papers have been published on this subject and their results differ according to the type of overload: (a) Severe and acute or subacute overload, obtained, for example, by an aortic stricture in guinea pigs which immediately induces signs of failure; in this case, mitochondrial oxygen consumption was severely depressed whatever the substrate utilized (from 8.6 to 4.5 μmol of O_2/mg h^{-1} with succinate, as in ref. 221) and was uncoupled with ATP production (7,78,157,221). The defect probably lies between the cytochrome c and the O_2 steps, and appears as early as within 30 min of stricture (221). It is associated with a decreased fatty acid oxidation in the presence of albumin, which has been related to a depressed level of the normal fatty acid carrier, carnitine (272). Similar data were reported in the failing phase of a chronic overload (236) and could be associated, at least in humans (191,192), with a decreased activity of mitochondrial enzymes. (b) Conversely, chronic compensatory hypertrophy in animals as well as in humans was associated

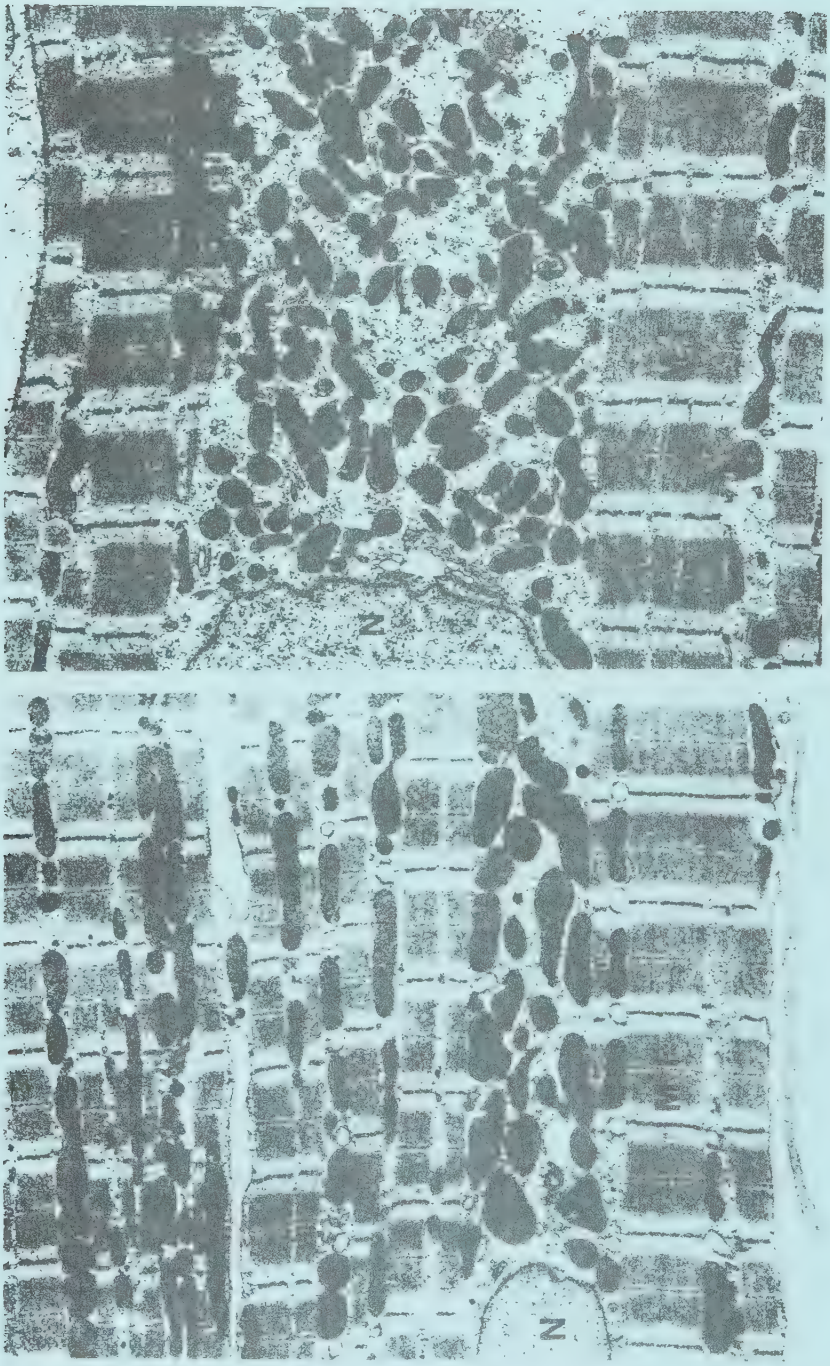


FIG. 6. Experimental cardiac overload. Micrographs. **A.**, Proliferation of small mitochondria in the early stage of a cardiac overload **(left)**. Control rat heart myocyte **(right)**. Rat heart ventricle 8 days after an aortic imcompetence. N, Nucleus; MF, myofibrils; m, mitochondria; magnification: ×4,000 (from Hatt et al. (98), reprinted by permission © Academic Press Inc.).

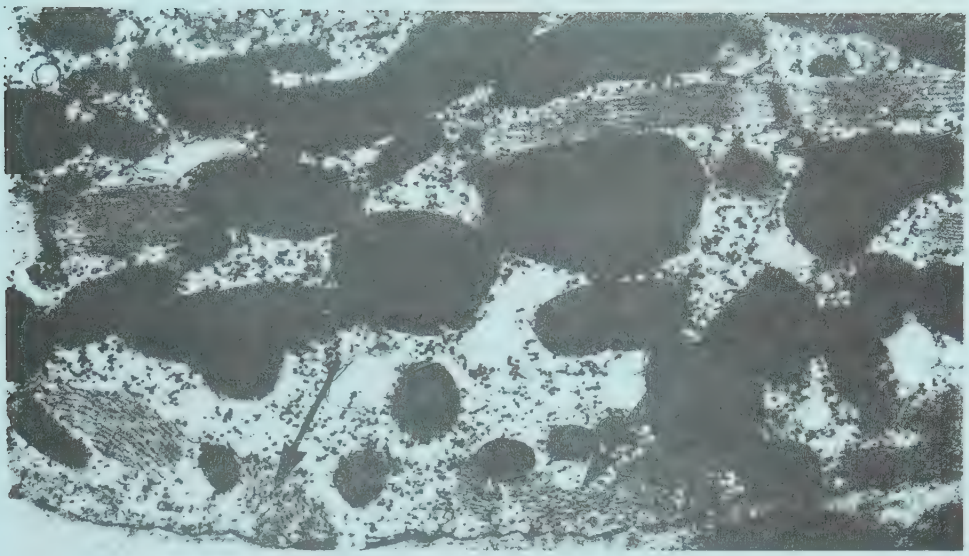
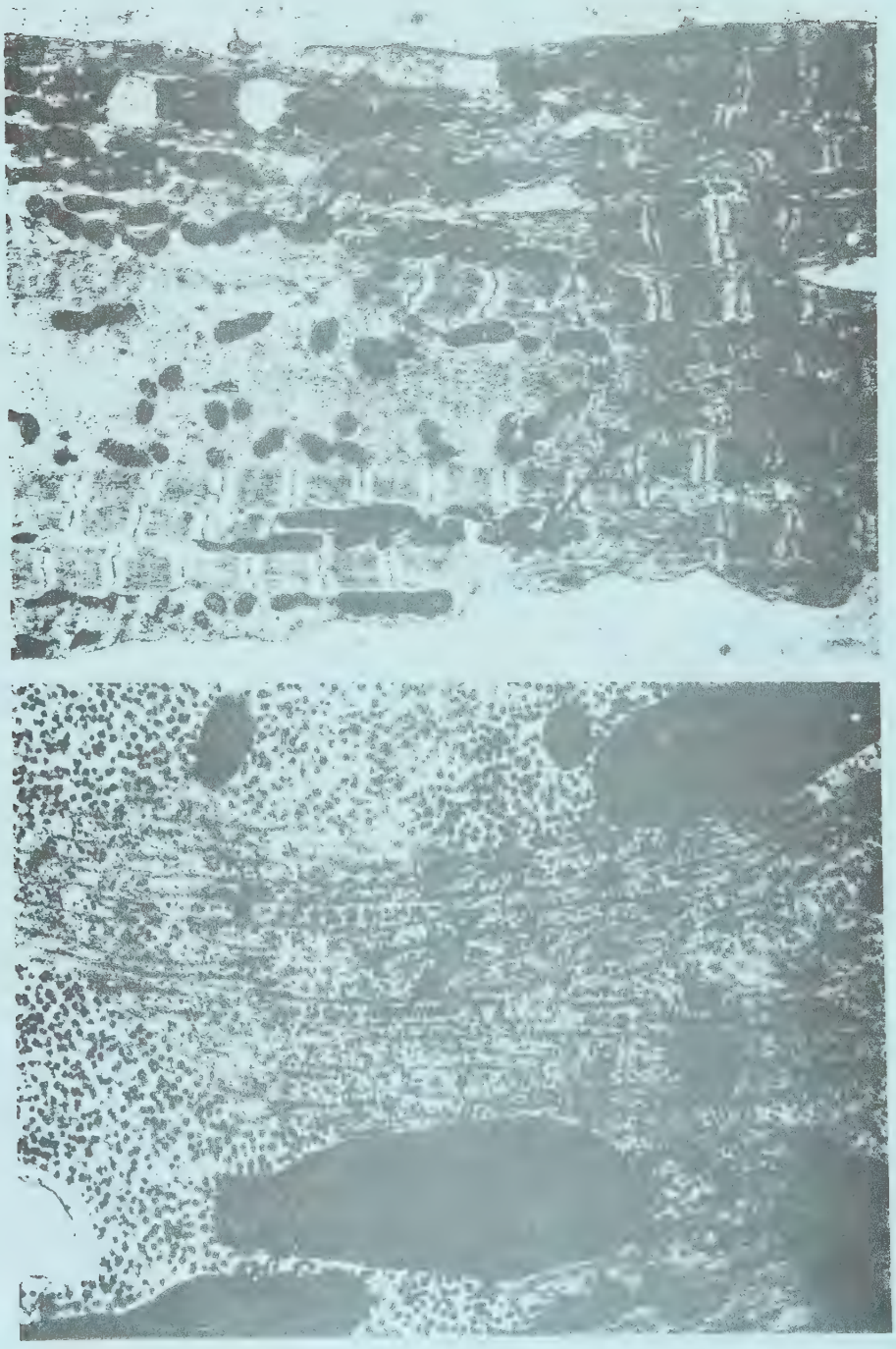


FIG. 6. B: New subsarcolemmal sarcomeres (↙) 5 days after an abdominal aortic stenosis in rats. Magnification: ×20,000.

FIG. 6. C: Sarcomerogenese in rat heart 8 days after an aortic insufficiency. Magnification: ×32.000 (98).



with a normal or, more likely, an improved mitochondrial function (46,157, 232,236,244,269).

In nonfailing dog hearts, for example, 1 year after the creation of an aortic stenosis, the mitochondrial oxygen consumption after ADP addition was increased by nearly 30% (from 15 to 19–22 μmol/mg h^{-1}) with a normally coupled phosphorylation (244). This was confirmed in a very typical model of compensatory hypertrophy by Cooper (39), who found an increase in the oxygen consumption during stage 4 of mitochondrial respiration; he was able to clearly correlate this modification with the above-mentioned increased oxygen consumption observed in isometry with the papillary muscle (92).

The debate concerning a possible deficit in mitochondria in overload centers mainly around the severity of cardiac overload. Models used by Schwartz's laboratory were all subacute heart failures produced by a severe aortic banding, whereas the pulmonary artery stenosis model in cats (39) or the 1–2 year study performed by Stoner (244) were obviously different from a purely clinical point of view. Technical problems suggested by Sobel (232) would certainly not explain these discrepancies.

In brief, it appears more and more likely that, during heart failure, a pronounced depression of the respiratory activity of mitochondria occurs, and is accompanied by a decoupling of the phosphorylation, (i.e., the situation partly resembles that observed in ischemia). In contrast, compensatory hypertrophy was very likely associated with an acceleration in the oxygen consumption in the basal state and a normal coupling. Recently, J. Moravec (176,177) has clearly shown *in situ*, by reflectance spectroscopy in chronic well-compensated hypertrophy due to an aortocaval fistula, that the cytochrome a_3 of the hypertrophied heart can be kept oxidized after a short anoxia at a lower intra cellular pO_2 than normal. This could reflect some adaptational change in the affinity of cytochrome oxidase for oxygen itself, secondary to an excessive turnover of acyl-CoA.

Myocardial Enzymes

The possibility of an adaptational modification in the isoenzymic pattern of mitochondrial or sarcoplasmic enzymes has not really been explored, except in the case of lactate dehydrogenase. Nevertheless, the measurement of the overall enzyme activity in a whole homogenate has already shown a depression of mitochondrial enzymes in the failing phase of chronic overload, therefore confirming the above-mentioned results.

In his precise and comprehensive papers on this subject, Peters (191,192) used micro-fluorimetric technique to estimate several enzymatic activities on biopsy

FIG. 6. **D:** Lysis and synthesis of contractile proteins 2 h after a severe thoracic aortic stenosis in the rabbit. The stricture was enough to induce pulmonary edema. **Top:** Several sarcomeres become irregular and disappear (↙), magnification: ×4,500. **Bottom:** New synthesized thin filaments associated with ribosomes and helicoidal polyribosomes (↙), magnification ×40,000.

samples in humans having either a valvular disease or an idiopathic cardiomyopathy (with which we do not deal in the present chapter). Although this work does not include any measurements on normal subjects, the comparison between valvulopathy with a good or poor function allows us to come to important conclusions: (a) the activity of two mitochondrial enzymes (malate and glutamate dehydrogenase) was depressed by 25% in patients having a poor ventricular function; (b) there was a striking increase in lactate dehydrogenase which appears with heart failure; this was also shown in experimental models (20,233); (c) there were no modifications in a sarcolemmal marker, the 5′ nucleotidase, or in several lysosomal enzymes. Similar measurements were made on humans on autopsy samples. They confirmed the decrease in mitochondrial enzymes (17), but not that of the lactate dehydrogenase (17,240) whose level was perhaps more susceptible to autolysis.

A lactate dehydrogenase isoenzyme shift toward a more skeletal muscle type now seems well established. An increase in the M subunits at the expense of the H subunits has indeed been reported after pulmonary artery stenosis in dogs (20,73), and after aortic stenosis in guinea pigs (233), or in rabbits (205). Revis (204,205) found that this redistribution correlated with the degree of fibrosis, both in humans and in animals, and has suggested that the appearance of the M subunits was due to the increase in concentration in the fibroblasts. This has not been confirmed and was somewhat contradicted by the fact that the lactate dehydrogenase profile was unchanged in the fibrotic tissue of an implanted sponge (73).

Conclusion

A defect in energy production may at some point worsen the performance of an overloaded heart, though this is not usually the case. However, the heart may fail after a long period of overload without any alteration in its energy metabolism. Chronic overload can modify several parameters of energy metabolism and this appears to be adaptational. The overall result is a normal creatine phosphate level in spite of an increased demand. The increased oxygen consumption observed both on isometrically contracting papillary muscle and *in vitro* on mitochondria, seems to provide good evidence for this process, and could reveal some internal change in the protein composition of the organelle. In this respect, the suggestion that the cytochrome oxidase affinity for oxygen may be improved, and the finding of an isoenzymic shift of lactate dehydrogenases toward the M form, was of interest. Most of these data were also found in human heart hypertrophy.

CELL GROWTH AND PROTEIN SYNTHESIS

Soon after overload, the heart weight increased as a consequence of a stimulation in protein synthesis. In the adult, hypertrophy of the heart was grossly proportional to that of myocytes and it is generally admitted that, at least in mild overloading, these cells do not divide, whereas the nonmuscular cell population increases in number. The situation was different in young growing animals, where myocytes

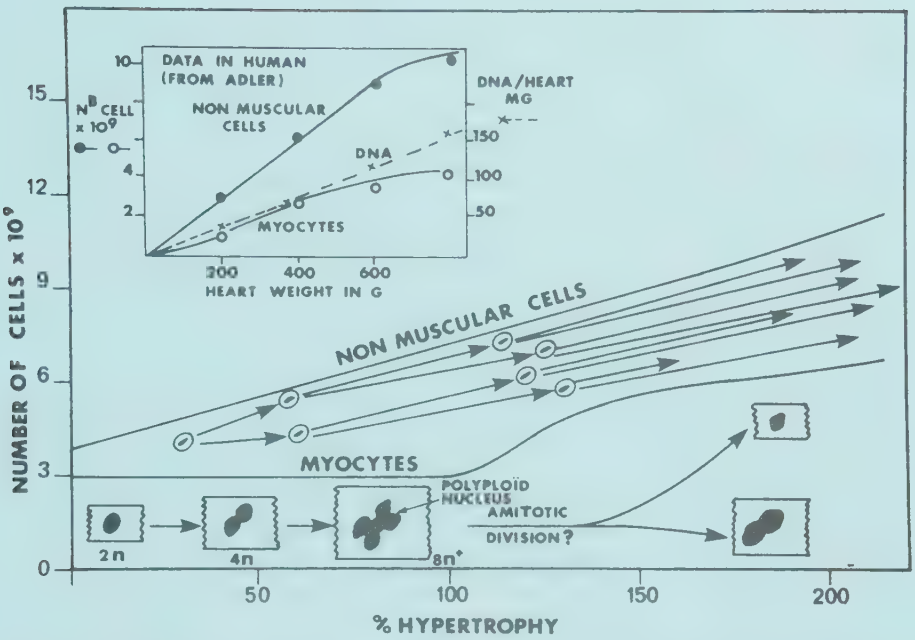


FIG. 7. Cell growth in cardiac overload. Nonmuscular cells divide with mitosis and myocytes increase in size whatever the model. In human myocytes nuclei became more polyploid and myocytes may divide without mitosis. Multiplication of myocyte in experimental models was controversial and may only be due to the moderate degree of hypertrophy under those conditions. In box, data in a human heart rearranged from Adler (1) which shows myocyte division parallel to the increase in DNA content.

It is very likely that the development of polyploidy leads to nonmitotic division of cells. Several data support this hypothesis, first advanced by A. S. Linzbach (158) who showed an increased number of muscle fibers and the appearance of amitotic divisions of myocytes owing to longitudinal cleavage between points of anastomosis in the syncytium. Since this pioneer work, several other authors have clearly shown by cytophotometry that in the human heart the increase in the myocardial content in DNA was not only because of a multiplication of connective tissue cells, as in the rat, but also owing to an increased amount of DNA per muscular nucleus, and a multiplication of myocytes. This is illustrated in Fig. 7. More recently, a planimetric study by Astorri (9) clearly defined a threshold for heart weight above which the myocytes divided and the average myocyte diameter became smaller. According to Astorri (9), a myocardial cell cannot increase its volume beyond 65 $\mu m^3 \times 3.10^{-3}$; this volume was that found in hearts weighing approximately 600 g (250 g of ventricular wall). In larger hearts, the average myocardial cell volume decreased mainly because of a decreased cell width, since the length still grew. This was due to a multiplication of myocytes by a factor of 1.5 to 2.0. To date, it is impossible to label such a process of multiplication as pathological or physiological since, as explained above for experimental models,

still possessed their capacity to multiply. Several excellent reviews have been published on cell growth (183,278,279) as well as on protein synthesis (181,219,281).

Cell Growth

A few days after a pressure overload in rats, the heart weight usually increased by 40 to 50%, the concentration in DNA was unchanged at around 1.5 μg/mg wt/wt, and consequently the amount of DNA per heart had increased by 30% (86,88). As shown by the Chicago group, this was mainly a consequence of the multiplication of nonmuscular cells, since the number of connective nuclei increased 12 weeks after banding from 4.28×10^8 per heart up to 5.30×10^8, whereas that of myocyte nuclei was unchanged or slightly decreased (around 1.1×10^8 per heart) (88,89). The frequency of polyploid nuclei, that is, nuclei in which an endoreplication of DNA has occurred, was estimated on Feulgen-stained sections by a microspectrophotometric method. In normal rats, no more than 2% of myocyte nuclei were polyploid. This percentage was slightly increased up to 4.2% after stenosis, but this enhancement did not account for more than 1% of the increase in DNA concentration in the myocardium (88). In this model, there were no mitosis figures in myocytes, and myocytes did not incorporate significant amounts of tritiated thymidine; mitosis and autoradiographic labeling of nuclei after injection of the DNA precursor were exclusively shown in nonmuscular cells (88,89). The size of myocyte doubles and that of endothelial and conjunctive cells increased, respectively, by 34 and 64%; the number of myocytes was unchanged whereas that of the nonmuscular cells increased by 48 and 35% (6,85,88,89,170,171,179) (Fig. 7).

Whether experimental models of cardiac hypertrophy may induce polyploidy of myocyte nuclei remains controversial, since it is not current practice to study large hypertrophic hearts with a size comparable to that observed in humans where polyploidy is well established (see below). Therefore, it is not possible to state that the development of this process is specific for one species, or whether it only occurs after a threshold of hypertrophy is reached. If the latter is true, it then becomes a new step in the process of adaptation to overload. Data in this field are rare: (a) Rumyantsev (209) found an increase in the incorporation of thymidine and in the degree of polyploidy 2 weeks after a myocardial infarction in rat atria but also in ventricular epicardium; (b) similar features were reported in experimental arterial hypertension after 3 months (137); (c) in aortic incompetence in rats, the heart weight increased faster than the volume of myocytes, suggesting hyperplasia (99).

The situation in humans was different. Normal human heart myocytes were unusually rich in polyploid nuclei. Whereas in children's hearts, 92% of the nuclei were diploid, in adults 16% were diploid, and 72% were tetraploid. Chronic hypertrophy further increased the proportion of highly polyploid cells; in adults, for example, a 900 g heart contained 31% of tetraploid nuclei and 55% were octoploid (1,2); bulky hearts were nearly exclusively composed of enormous polyploid cells. Some data suggest that the development of polyploidy correlates with the myosin change (144).

it is also impossible to reach such a degree of hypertrophy with physiological stimuli, as, for example, exercise.

In neonatal rats (2 days old), pressure overload had an entirely different effect, since it stimulated the multiplication of both muscular and nonmuscular cells: after prelabeling with [^{3}H] thymidine, the number of labeled nuclei increased, respectively, from 9 to 73/1000 and from 23 to 104/1000 (52). It is interesting to note that overloading under these conditions does not alter the myocardial mechanics, implying that the multiplication of cells was a better adaptational process. This hyperplasia in neonatal animals was confirmed by nonoverloaded models.

Protein Synthesis

As initially shown by Hatt (97), the stimulation of protein synthesis after overloading of the heart was not a retarded process but, depending on the sensitivity of the method employed, could be observed as early as 30 min after an acute aortic constriction in rabbits. With the continuous infusion flow method, Everett (58,59) showed a stimulation of protein synthesis within 1 day after stenosis. In pressure overload this was reflected by the extreme rapidity of the heart weight to reach a plateau, by the third to fifth day in rats after a stenosis. The situation was different in diastolic overload where a plateau for cardiac hypertrophy was reached later, usually by the first month (145,175) and where it was shown, both *in vitro* on an isolated working heart preparation (217), and *in vivo* (175), that a volume overload could not stimulate protein synthesis as early as a pressure overload (see Fig. 6B, C, and D).

The principle for studying protein synthesis was to inject a labeled amino acid as a pulse or continuously, and then to measure the ratio of the specific activity of a precursor, such as intracellular free amino acid, and of the product, such as myosin (281). The main controversial points concerning this type of approach were: (a) the cellular heterogeneity of the heart, which contains nearly 60% of nonmuscular cells; (b) the recirculation of the labeled amino acid after the normal proteolysis; (c) the multiplication of precursor pools : plasma or cellular free amino acids, acyl tRNA (transfer ribonucleic acid amino acyl), "easily releasable contractile proteins" (56); (d) the heterogeneity of proteins, for example, it was shown that the turnover rate of myosin subunits as well as that of myosin isozymes was different (265,280); (e) the fact that cardiac overload per se cannot be measured in a steady-state condition. This represented the main problem.

Several techniques have been used in response to these questions: the isolation of pure myocytes (42), the continuous infusion of a labeled precursor which maintains the precursor specific activity in a steady-state for at least 6 h (58,59,75,175), the isolation of the specific tRNA amino acyl (163), and of pure proteins subunits (57,175). The *in vitro* model of a working heart, which was extensively developed in guinea pigs by Schreiber (219) and in the rat by Hjalmarson (105) and Morgan (178), was of special interest since it was able to reproduce, within 1 to 3 hours, the stimulation of protein synthesis observed *in vivo* under conditions of a constant

extracellular specific radioactivity. Nevertheless such a model has several peculiarities which will be developed below.

It is now clear that the increase in cardiac mass results from a stimulation in protein synthesis by a factor of 2 to 4. This was shown both with the pulse labeling and the continuous infusion flow techniques after pressure and volume overload, *in vivo* as well as on a working heart preparation (58,59,71,90,105,175,242,283,285). This increased rate of synthesis returns to normal after a week or two during systolic overload. Iavich found that the rate of synthesis was depressed with aging and in the failing step of overloading (115); this was recently contradicted in our laboratory (175). The enhancement of synthesis was demonstrated on total proteins but also on myosin, myoglobulin, cytochrome c, and collagen (105,162,180,231). The rate of synthesis of various contractile proteins was extremely heterogenous (280) and the myosin heavy chains, for example, were renewed twice as fast as actin (4 and 2 days). This relative ratio remained unaffected by pressure overload, which also accelerated the synthesis of both proteins, as shown by applying the continuous infusion flow technique to pure proteins (unpublished data from our laboratory).

The working heart model was slightly different in its response to overload, since myosin synthesis, but not myoglobin and collagen, was stimulated (215). Moreover, the stimulation was different for myosin heavy and light chains, the first being more sensitive to overload than the second (57).

Data concerning the estimation of proteolysis remain rather controversial. In theory, it is simple to calculate lysis by subtracting the above mentioned rate of synthesis from the rate of growth of the tissue. On the basis of a two pool model, Morkin concluded that degradation increased parallel to synthesis and peaked within a week after banding (180). Conversely, by using two different labeled amino acids, it was possible to find a normal lysis in an overloaded working heart (216). The continuous infusion flow technique which clearly showed an increased lysis in hypertrophy of skeletal muscle (141) also indirectly showed a similar "wasting" effect in cardiac overload which was accompanied by a normal intracellular free amino acid radioactivity (57,58,175).

The stimulation of protein synthesis leading to hypertrophy was undoubtedly an adaptational process, whose usefulness was shown by using protein synthesis inhibitors such as puromycin, actinomycin D, or a protein-poor diet, all of which induced a rapid failure after overload (199,285).

The free amino acid content of an overloaded heart was usually considered as normal except for its concentration of taurine, which was increased by a factor of 3 to 4 in failing hearts from humans or from experimental models (112,194). It was unchanged in compensated hypertrophy (113). This modification could be a consequence of adrenergic stimulation by stress induced by failure (114).

Ribonucleic Acids (RNA) and the Nucleus

The above-mentioned remarks concerning techniques used to measure protein synthesis can also be applied to RNA.

After pressure overload, the mass of total RNA as well as its concentration increased by 50% by the second day, and the average radioactivity after a labeled precursor injection in the form of uridine usually peaked at the same time (61,71,117,133,213,255). The turnover rate of the RNA as a whole was estimated at around $t^1/_2$ of 5 days and was multiplied by 4 under these conditions. This RNA, in the form of a microsomal pellet was able, *in vitro*, to incorporate more quickly a greater quantity of amino acids into protein when purified from an overloaded heart (182,212); however, it is still not clear whether it is more active, or whether it contains more messenger RNA per unit of total RNA (134,182,212). In fact such estimations based upon a mixture of different RNA were rather invalid since a high labeling of transfer RNA and of nuclear RNA preceded that of the other components. In contrast, the ribosomal subunit labeling was always homogenous (61).

The main problem to be resolved is whether protein synthesis under these conditions was controlled at the pre- or at the posttranscriptional level. Very few papers have been published on this subject, with none of them using recent methods developed in this field in molecular biology. But they clearly postulate an increased synthesis in messenger RNA: (a) *in vitro*, the activity of the total RNA isolated from overloaded heart was not modified by adding an excess of messenger RNA (182,212); (b) in labeled polysomes isolated from overloaded hearts and analyzed on a sucrose gradient, there was a 300% increase in activity in the heavier aggregates where messenger RNA was most abundant (213); (c) though not really specific, actinomycin D was an inhibitor of mRNA formation and was able to decrease the activity of total RNA (172,199,213,285); (d) attempts to isolate the poly A+ messenger by affinity chromatography showed an increase in synthesis which parallels that of total RNA (255) before rapidly returning to normal (172); similar findings were reported for poly A−mRNA (172), although the nature of these RNAs have not been clearly defined; (e) studies on RNA polymerase activity have also shown a rapid increase in Mn^{2+}-activated α-amanitin-inhibited activity, which corresponds to the activity of the messenger RNA polymerase (43,123,214).

Cytoplasmic RNA was synthesized only in the nucleus. Histological evidence of stimulated nuclear activity was provided by showing a multiplication in both nucleoli (1,100,170) and nuclear pores (83), with no significant change in the ratio of noncondensed to condensed chromatin (4:1). As shown above, the specific activity of nuclear RNA was probably increased very early on (133). *In vitro* nuclei, as well as chromatin from hypertrophic hearts, were able to incorporate more [^{3}H]uridine into RNA (71,184); a RNA polymerase activity which was specific for ribosome synthesis was stimulated (43,123,214), but at a later time than that which was specific for messenger RNA synthesis. This activity slowly returned to normal by the second week after aortic stenosis.

RNA synthesis usually works in two different ways: (a) *de novo* synthesis directly from orotic acid, and (b) "salvage" pathway, both of which are rate-limited by uridine kinase (166). It is well known that the heart is the only organ to synthesize most of its RNA through the salvage pathway, and therefore the best precursor for studying this metabolism is not orotic acid but uridine or phosphate (208). The

ARTICLE 6

specific activity of uridine kinase was unchanged 2 h after aortic banding, but increased from 0.171 nmol/min to 0.254 by the second day and remained higher than normal at the thirteenth day. In contrast, enzymes which converted uracil to uridine and which phosphorylated UMP or orotic acid were normal (166). As a consequence, the specific radioactivity of UMP after uridine injection was greatly enhanced early on (133,203) and the synthesis of adenine nucleotides nearly tripled by the second day (282). Such a stimulation of the pentose pathway was confirmed by an enhanced activity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (256) in chronic overload.

The study of the myocardial polyribosomal population was difficult in adult hearts and most methods never had a yield superior to 20–30%. In a sucrose gradient, the normal peak corresponding to large polysomes was shown to increase after aortic stenosis *in vivo* (171) and on an overloaded working heart *in vitro* (106) whereas Moroz (182) and Turto (255) found a normal profile. Using electron microscopic counting, Hearn (101) confirmed these latter results and also found a normal polysomal population after pulmonary banding.

Initial Events

Before confronting the problem of the trigger mechanism which initiates protein synthesis, it is necessary to summarize briefly biochemical findings concerning the earliest modifications observed in overload.

Polyamines can enhance RNA polymerase activity in both bacterial and mammalian systems. This effect, although poorly specific, has also been studied in heart overload. A parallel enhancement of both the polyamines themselves (i.e., spermine, spermidine and putrescine) and the activity of the enzymes involved in their biosynthetic pathway (ornithine and *S*-adenosyl-L-methionine decarboxylases) was observed as early as 24 h after banding (65,136). Both enzymatic activity and substrate levels increased by a factor of 1.5 to 2. This process was not univalent: in the rat, after aortic stenosis, the molar ratio spermidine to spermine rose from 0.92, as a control value, to 1.56 within 48 h and then remained high for at least 10 days. After a similar overload in rabbits, this molar ratio dropped from 1.4 to 0.3 within 96 h. This was interpreted as a sign of a rapidly growing system in the rat and a slow process in the rabbit (ref. in 65).

The stimulation of RNA polymerase activity was extremely precocious, especially for the polymerase which synthesizes messenger RNA. Although there are as yet no studies on the time-course of events, several data favor an initial stimulation of messenger synthesis which, depending on the type of model, is followed a few days later by a progressive increase in ribosomal RNA. A preliminary study in our laboratory which simultaneously measured protein synthesis and synthesis of a well-defined portion of the ribosomal RNA, the 28 S subunits, clearly showed that the stimulation of protein synthesis occurs 2 or 3 days before that of the ribosomal subunit. In other words, evidence suggests that the heart is able to initiate its protein

synthesis by using the preexisting ribosome, thus postulating that the initial signal is an increased amount of "active" messenger RNA. S. Schreiber was able to stimulate the RNA polymerase activity of nuclei *in vitro* by artificially increasing the hydrostatic pressure of the syringe containing the organelles and suggested that the single increase in intraventricular pressure was the signal (218).

Several other signals have been proposed: (a) a drop in ATP or creatine phosphate was suggested by Meerson (171) and was, of course, an excellent candidate as a signal for a decline in efficiency. In the same vein, an increase in creatine was suggested as a trigger, on the basis of its well-known stimulating effect on culture cells (116). In contrast to this still valid hypothesis, Zimmer was able to normalize the low ATP level by perfusing 200 mg/kg. h^{-1} of ribose without any modification in protein synthesis (284); (b) a circulating molecular signal was suggested by Hammond (93), who was able to stimulate protein synthesis by perfusing a normal heart with the sarcoplasm from an overloaded heart or by cross-circulation. V. Schreiber et al. (220) also reported data in favor of a digitalislike blood factor able to stimulate protein synthesis.

The trigger role of hormones (review in ref. 34) was ruled out by several investigations which were able to reproduce nearly all the biochemical consequences of overload on an isolated working heart (105,106,212–219). Somathormone did not modify the course of pressure overload (14).

The Trigger Mechanism

In cardiac overload, several parameters of the cardiac function were altered and one or several of them triggered the production of one or several molecular signals. (a) A trigger role for stretch was demonstrated, at least in cell cultures from skeletal muscle, by growing myotubes on a frame whose diameter was increased up to 10%. This stimulated amino acid incorporation into cell, proteins, and myosin heavy chains (258); (b) work itself was ruled out as a trigger, since the enhancement of protein synthesis obtained in a Langendorff preparation, when the pressure perfusion was elevated, was observed both on a beating heart and on a heart arrested by K^+ injection (219,253). This effect of pressure was independent of its effect on coronary flow and was observed at a constant flow level (217); (c) when both tension development at constant length and passive stretch were studied on a papillary muscle, it was shown that these two factors independently enhanced the incorporation of labeled phenylalamine into proteins (193), which confirmed previous findings on cultured cells (258) (see a) and on isolated hearts (219,253).

The myocardium adapts to overload by both increasing its mass and modifying its protein composition. These two mechanisms were not directly related to each other, at least when we compared pressure and volume overload. In the former, the development of hypertrophy, the lowering of the speed of shortening, and the changes in myosin and in sarcoplasmic reticulum, were not simultaneous but generally occurred early in the course of overload. In the latter, hypertrophy was the main, and at times, the only adaptational factor. Given these results, it now appears necessary to separate the trigger mechanism for overall protein synthesis from a trigger which initiates a change in gene expression.

(a) The mechanism which initiates protein (or mRNA) synthesis must be related to some initial mechanical events which occur in response both to volume and to pressure overload. It is delayed in the former and rapid in the latter. The force *(F)* developed by the wall (wall stress) to maintain pressure depends on the pressure *(P)*, the radius of the cavity *(r)* and the thickness of the wall *(h)*, according to Laplace's law: $F = P \times r/2h$. Wall stress increases rapidly in response to an increased afterload which elevates pressure *(P)*; the consequence of volume overload is not an increased pressure, but a slow increase in the radius r and a decrease in h. Both types of overload increase work, power, and wall stress and, since protein synthesis may be stimulated in an arrested heart (see above), the best candidate as a trigger could not be the work, but rather the wall stress. This is in good agreement with Peterson's work showing that both isometric tension and stretch can stimulate the process (193).

(b) Mechanical and electrophysiological modifications, as well as alterations in myosin structure, sarcoplasmic reticulum, or mitochondria function imply a concordant change in the gene expression which leads to improved efficiency of the contraction at a cellular level. We propose that the trigger for this change is a drop in efficiency. Muscles are adapted to shorten at a velocity corresponding to their optimal velocity (Fig. 8).[1] From a pure mechanical point of view (Fig. 1), on a force/velocity curve, a pressure overload will increase afterload and lower the instantaneous shortening velocity. This will result (Fig. 8) in decreased efficiency. Volume overload, by increasing the end-diastolic pressure, will increase preload, P_0, and will slightly accelerate the instantaneous speed of shortening. Since, at rest, the heart shortens at a velocity below that of its optimum velocity, efficiency will remain unchanged. It is proposed that the changes in gene expression, especially those concerning myosin isoenzymes, allow the heart to adapt in order to maintain normal efficiency at rest for a slower shortening velocity (Fig. 8). This explains the rapid modifications observed in pressure overload, and the relatively slow changes or absence of changes reported in volume overload.

An important gap remains in our knowledge of what happens between the cellular level and that of the organ (i.e., the heart). Nevertheless, the main point is that these qualitative changes improve efficiency at the cellular level.[2]

SUMMARY

Mechanical overload in the heart induces two different types of adaptational mechanisms. (a) From a qualitative point of view, the maximum speed of shortening is depressed in relation to a myosin isoenzymic change responsible for decreased ATPase and, although the relaxation appears normal from a physiological point of

[1]This has been shown clearly by G. Goldspink (in *Comparative Physiology—Functional Aspects of Structural Materials*, edited by L. Bolis, H. P. Maddrell, and K. Schmidt-Nielsen, pp. 173–185. North Holland, Amsterdam, 1975) with skeletal muscles.

[2]Catecholamine reserves were greatly decreased in chronic overload. This is extremely well documented and was not detailed in review because it has been extensively analyzed elsewhere (22,32).

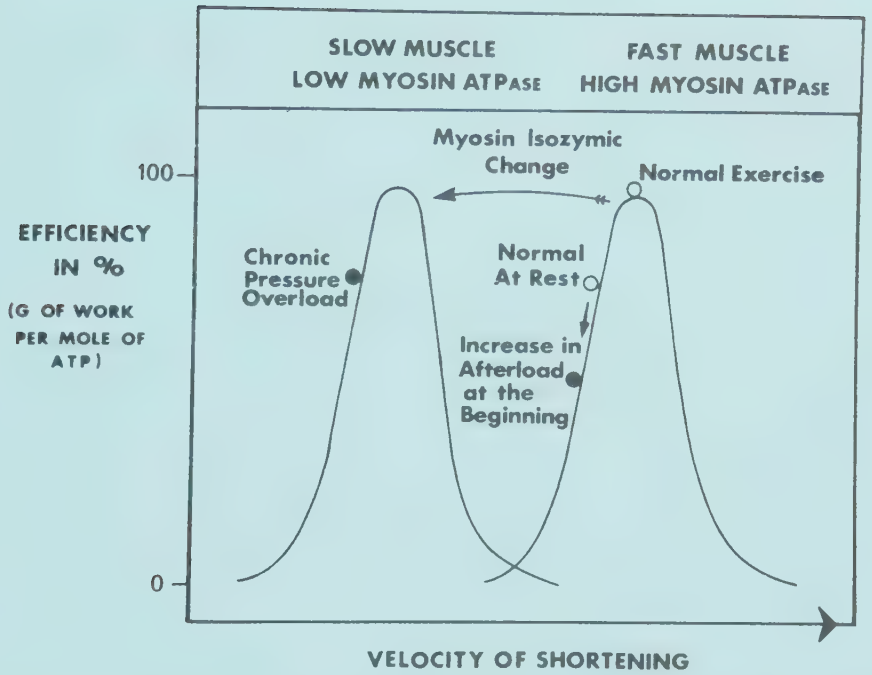


FIG. 8. A drop in efficiency as a trigger for the myosin isoenzymic change. Normal muscle shortens at a velocity near (at rest) or at (during exercise) its maximum efficiency. An abrupt afterload depressed the instantaneous shortening velocity (see Fig. 1) and therefore the efficiency. The myosin isozymic redistribution lowers ATPase, slows the maximum unloaded shortening velocity, and forces the muscle to change its efficiency/velocity curve. Therefore it is a true adaptational process since it corrects the fall in efficiency.

view, the existence of an abnormality in Ca^{2+} uptake in the sarcoplasmic reticulum has been well documented. Both of these processes appear to improve efficiency by decreasing the heat produced per gram of tension. The existence of a large broadening of the action potential has now been well established, but it remains unexplained at the biochemical level. The functioning of mitochondria is rather controversial, and although it has been shown that they are both more abundant and smaller, the reason why their respiratory index changes remains unknown. (b) From a quantitative point of view, the adult heart adapts to overload by increasing its mass. This is mainly a consequence of a hypertrophy of the myocytes and a mitotic multiplication of nonmuscular cells. Data suggest that myocyte amitotic divisions may occur, at least in humans, and perhaps in very sizeable experimental hypertrophy. To this phenomenon has been added the development of polyploidy of myocyte nuclei, which seems to be specific to certain species. The stimulation of protein synthesis occurs very soon after pressure overload, and is delayed in volume overload; protein lysis also increases, although this is controversial. The process occurs whatever the proteins. This is accompanied by increased nuclear activity and a stimulation in RNA synthesis, which is especially precocious for

messenger RNA. Among the very early events which could be potential signals for protein synthesis, attention has been focused on polyamine, RNA polymerase, and uridine kinase.

The trigger mechanism, of course remains hypothetical. As a trigger for protein synthesis, several data suggest an increase in wall stress and stretch; a drop in efficiency is suggested as a trigger for qualitative changes.

REFERENCES

1. Adler, C. P., and Costabel, U. (1975): Cell number in human heart in atrophy, hypertrophy, and under the influence of cytostatics. In: *Pathophysiology and Morphology of Myocardial Cell Alteration*, edited by A. Fleckenstein, pp. 343–355. University Park Press, Baltimore.
2. Adler, C. P., and Sandritter, W. (1980): Alterations of substances (DNA, myoglobin, myosin, proteins) in experimentally induced cardiac hypertrophy and under the influence of drugs. *Basic Res. Cardiol.*, 75:126–138.
3. Adomian, G. E., Laks, M. N., Morady, F., and Swan, H. J. C. (1974): Significance of the multiple intercalated disc in the hypertrophied canine heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6:105–110.
4. Albin, R., Dowell, R. T., Zak, R., and Rabinowitz, M. (1973): Synthesis and degradation of mitochondrial components in hypertrophied rat hearts. *Biochem. J.*, 136:629–637.
5. Alpert, N. R., and Mulieri, L. A. (1981): The utilization of energy by the myocardium hypertrophied secondary to pressure overload. In: *The Heart in Hypertension*, edited by B. E. Strauer, pp. 153–163. Springer Verlag, Berlin.
6. Anversa, P., Olivetti, G., Melissari, M., and Loud, A. V. (1978): Adaptative growth of rat papillary muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10:3.
7. Argus, M. F., Arcos, J. C., Sardesai, V. M., and Overby, J. L. (1964): Oxidative rates and phosphorylation in sarcosomes from experimentally-induced failing rat heart. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 117:380–383.
8. Aronson, R. S. (1980): Characteristics of action potentials of hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension. *Circ. Res.*, 47:443–454.
9. Astorri, E., Bolognesi, R., Colla, B., Chizzola, A., and Visioli, O. (1977): Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 9:763–775.
10. Barany, M. (1967): ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, 50:197–216.
11. Berson, G., and Swynghedauw, B. (1973): Myofibrillar ATPase in rat's experimental heart failure produced by a two-step mechanical overloading. *Cardiovasc. Res.*, 7:464–469.
12. Berson, G., Samuel, J. L., and Swynghedauw, B. (1978): A comparative study of the cardiac troponin inhibitory factor from mammalians. *Pflugers Arch.*, 374:277–283.
13. Bertrand, M. E., Carre, A. G., Guiestet, A. P., Lefebvre, J. M., Desplanque, L. A., and Lekieffre, J. P. (1977): Maximal exercise in normal subjects: changes in coronary flow, contractility and myocardial extraction of FFA and lactate. *Eur. J. Cardiol.*, 5/6:481–491.
14. Beznak, M. (1952): The effect of the pituitary and growth hormone on the blood pressure and on the ability of the heart to hypertrophy. *J. Physiol. (London)*, 116:74–83.
15. Beznak, M. (1955): Changes in heart weight and blood pressure following aortic construction in rats. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33:995–1002.
16. Bing, O. H., Matsushita, S., Fanburg, B. L., and Levine, H. J. (1971): Mechanical properties of rat cardiac muscle during experimental hypertrophy. *Circ. Res.*, 28:234–245.
17. Bing, R. J., Wu, C., and Gudbjarnason, S. (1964): Mechanism of heart failure. *Circ. Res.*, XIV and XV suppl. II: 64.
18. Bishop, S. P., and Cole, C. R. (1969): Ultrastructural changes in the canine myocardium with right ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Lab. Invest.*, 20:219–229.
19. Bishop, S. P., and Cole, C. R. (1969): Production of externally controlled progressive pulmonic stenosis in the dog. *J. Appl. Physiol.*, 26:659–663.
20. Bishop, S. P., and Altschuld, R. A. (1970): Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure. *Am. J. Physiol.*, 218:153–159.

ARTICLE 6

21. Blayney, L., Stephens, M. R., Lompré, A. M., Schwartz, K., Benning, S., Middleton, K., and Henderson, A. H. Biochemical changes correlated in a single model of mechanically induced myocardial hypertrophy. In press.
22. Braunwald, E., Ross, J. Jr., and Sonnenblick, E. H. (1967): *Mechanisms of Contraction of the Normal and Failing Heart*. Little, Brown, Boston.
23. Breisch, E. A., Bove, A. A., and Phillips, S. J. (1980): Myocardial morphometrics in pressure overload left ventricular hypertrophy and regression. *Cardiovasc. Res.*, 14:161–168.
24. Brutsaert, D. L., and Paulus, W. J. (1977): Loading and performance of the heart as muscle and pump. *Cardiovasc. Res.*, 11:1–16.
25. Brutsaert, D. L., de Clerck, N. M., Goethals, M. A., and Housmans, P. R. (1978): Relaxation of ventricular cardiac muscle. *J. Physiol. (London)*, 283:469–480.
26. Buckley, N. M., and Tsubo, K. K. (1961): Cardiac nucleotides and derivatives in acute and chronic ventricular failure of the dog heart. *Circ. Res.*, 9:618–625.
27. Carey, R. A., Bove, A. A., Coulson, R. L., and Spann, J. F. (1978): Normal cardiac myosin ATPase and mechanics in pressure overload with digitalis treatment. *Am. J. Physiol.*, 234:H253–H259.
28. Carey, R. A., Bove, A. A., Coulson, R. L., and Spann, J. F. (1978): Recovery of myosin ATPase after relief of pressure-overload hypertrophy and failure. *Am. J. Physiol.*, 234:711–717.
29. Carey, R. A., Natarajan, G., Bove, A. A., Coulson, R. L., and Spann, J. F. (1979): Myosin adenosine triphosphatase activity in the volume overloaded hypertrophied feline right ventricle. *Circ. Res.*, 45:81–87.
30. Caroni, P., and Carafoli, E. The Ca^{2+} pumping ATPase of heart sarcolemma. Characterization, calmodulin dependence and partial purification. *J. Biol. Chem.*, 256:3263–3270.
31. Chandler, B. M., Sonnenblick, E. H., Spann, J. F. Jr., and Pool, P. E. (1967): Association of depressed myofibrillar adenosine triphosphatase and reduced contractility in experimental heart failure. *Circ. Res.*, 21:717–725.
32. Chidsey, C. A., Sonnenblick, E. H., Morrow, A. G., and Braunwald, E. (1966): Norepinephrine stores and contractile force of papillary muscle from the failing heart. *Circulation*, 33:43–51.
33. Chidsey, C. A., Weinbach, E. C., Pool, D. E., and Morrow, A. C. (1966): Biochemical studies of energy production in the failing human heart. *J. Clin. Invest.*, 45:40–53.
34. Cohen, J. (1974): Role of endocrine factors in the pathogenesis of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 34–35 suppl. II. 49–57.
35. Coulson, R. L., Yazdanfar, S., Rubio, E., Boue, A. A., and Lemole, G. M. (1977): Recuperative potential of cardiac muscle following relief of pressure overload hypertrophy and right ventricular failure in the cat. *Circ. Res.*, 40:41–49.
36. Cooper, G., Harrison, C. E., Puga, F., Zujko, K., and Coleman, H. N. (1972): The mechanism for the paradoxical increase in myocardial oxygen consumption in pressure overload hypertrophy. *Circulation*, 46:suppl. II:11–66.
37. Cooper, G. IV, Puga, F. J., Zujko, K. L., Harrison, C. E., and Coleman, H. N. III (1973): Normal myocardial function and energetics in volume-overload hypertrophy in the cat. *Circ. Res.*, 32:140–148.
38. Cooper, G. IV, Satava, R. M., Harrison, C. E., and Coleman, H. N. III (1974): Normal myocardial function and energetics after reversing pressure-overload hypertrophy. *Am. J. Physiol.*, 226:1158–1165.
39. Cooper, G. IV, Tomanek, R. J., Ehrhardt, J. C., and Marcus, M. L. (1981): Chronic progressive pressure overload of the cat right ventricle. *Circ. Res.*, 48:488–497.
40. Cummins, P., and Perry, S. V. (1978): Troponin I from human skeletal and cardiac muscles. *Biochem. J.*, 171:251–259.
41. Cutilletta, A. F., Erinoff, L., Heller, A., Low, J., and Oparil, S. (1977): Development of left ventricular hypertrophy in young spontaneously hypertensive rats after peripheral sympathectomy. *Circ. Res.*, 40:428–434.
42. Cutilletta, A. F., Aumont, M. C., Nag, A. C., and Zak, R. (1977): Separation of muscle and non-muscle cells from adult rat myocardium and application to the study of RNA polymerase. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 9:399–407.
43. Cutilletta, A., Rudnick, M., and Zak, R. (1978): Muscle and nonmuscle cell RNA polymerase activity during the development of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10:677–687.
44. Cutilletta, A. F. (1980): Regression of myocardial hypertrophy. II. RNA synthesis and RNA polymerase activity. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12:827–832.

ARTICLE 6

45. Dallman, P. (1966): Cytochrome c in normal and hypertrophied heart. *Nature*, 212:608–609.
46. Dart, C. H. Jr., and Holloszy, J. O. (1969): Hypertrophied nonfailing rat heart. Partial biochemical characterization. *Circ. Res.*, 25:245–253.
47. Davidova, S. M., Kalamkarova, M. B., Kolesava, O. E., Podlubnaja, Z. A., Chechulina, I. S., and Strankfeld, I. G. (1976): Structural and enzymatic properties of myosin during chronic heart failure. *Biophysika*, 21:295–298.
48. Delcayre, C., and Swynghedauw, B. (1975): A comparative study of heart myosin ATPase and light subunits from different species. *Pflügers Arch.*, 355:39–47.
49. Deloche, A., Fontaliran, F., Fabiani, J. N., Pennecot, G., Carpentier, A., and Dubost, C. (1972): Étude expérimentale de la revascularisation chirurgicale précoce de l'infarctus du myocarde. *Ann. Clin. Thorac. Cardiovasc.*, 11:89–105.
50. Dhalla, N. S., Das, P. K., and Sharma, G. P. (1978): Subcellular basis of cardiac contractile failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10:363–385.
51. Dowell, R. T. (1976): Myocardial contractile function and myofibrillar adenosine triphosphatase activity in chemically sympathectomized rats. *Circ. Res.*, 39:683–689.
52. Dowell, R. T., and McManus, III, R. E. (1978): Pressure-induced cardiac enlargement in neonatal and adult rats. Left ventricular functional characteristics and evidence of cardiac muscle cell proliferation in the neonate. *Circ. Res.*, 42:303–310.
53. England, P. J. (1975): Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. *FEBS Lett.*, 50:57–60.
54. Entman, M. L., Levey, G. S., and Epstein, S. E. (1969): Demonstration of adenyl cyclase activity in canine cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35:728–733.
55. Erdmann, E., Korawietz, W., and Koch, M. (1979): Cardiac glycoside receptors in disease: the number of ouabain sites in human erythrocytes is subject to regulation. In: *Na, K-ATPase—Structure and Kinetics*, edited by J. C. Skou, and J. G. Nørby, pp. 517–524. Academic Press, London.
56. Etlinger, J. D., Zak, R., Fischman, D. A., and Rabinowitz, M. (1975): Isolation of newly synthetized myosin filaments from skeletal muscle homogenates and myofibrils. *Nature*, 255:259–261.
57. Evans, C., Schreiber, S. S., Oratz, M., and Rothschild, M. A. (1978): Synthesis of myosin heavy and light chains in the afterloaded guinea-pig right ventricle. *Cardiovasc. Res.*, 12:731–743.
58. Everett, A. W., Taylor, R. R., and Sparrow, M. P. (1977): Protein synthesis during right-ventricular hypertrophy after pulmonary-artery stenosis in the dog. *Biochem. J.*, 166:315–321.
59. Everett, A. W., Sparrow, M. P., and Taylor, R. R. (1979): Early changes in myocardial proteins synthesis *in vivo* in response to right ventricular pressure overload in the dog. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11:1253–1263.
60. Fabiato, A., and Fabiato, F. (1978): Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann. NY Acad. Sci.*, 307:491–522.
61. Fanburg, B. L., and Posner, B. I. (1968): Ribonucleic acid synthesis in experimental cardiac hypertrophy in rats. I. Characterization and kinetics of labeling. *Circ. Res.*, 23:123–135.
62. Fanburg, B. L. (1970): Experimental cardiac hypertrophy. *N. Engl. J. Med.*, 282:723–732.
63. Feinstein, B. B. (1962): Effects of experimental congestive heart failure, ouabain and asphyxia on the high-energy phosphate and creatine content of guinea pig heart. *Circ. Res.*, 10:333–346.
64. Feldman, D. A., and Weinhold, P. A. (1977): Calcium binding to rat heart plasma membranes: isolation and purification of a lipoprotein component with a high calcium binding capacity. *Biochemistry*, 16:3470–3476.
65. Feldman, M. J., and Russell, D. H. (1972): Polyamine biogenesis in left ventricle of the rat after aortic constriction. *Am. J. Physiol.*, 222:1199–1203.
66. Fenton, J. C., Gudbjarnason, S., and Bing, R. J. (1966): Metabolism of the heart in failure. Symposium on congestive heart failure. Second ed. Amer. Heart Association monograph 1:32.
67. Ferdman, D. L., Himmelreich, N. G., and Dyadyusha, G. P. (1970): The enzyme activity in a detergent-treated sarcolemma of skeletal muscles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 219:372–378.
68. Ferrans, V. J., Buja, L. M., and Maron, B. J. (1976): Sarcolemmal alterations in cardiac hypertrophy and degeneration. In: *The Sarcolemma*, edited by P. E. Roy and N. S. Dhalla, pp. 395–419. University Park Press, Baltimore.
69. Fisher, V. J., and Kavaler, F. (1971): Maximal force development by hypertrophied right ventricular papillary muscles remaining *in situ*. In: *Cardiac Hypertrophy*, edited by N. R. Alpert, pp. 371–386. Academic Press, New York.

ARTICLE 6

70. Flaim, S. F., Minteer, W. J., Nellis, S. H., and Clark, D. P. (1979): Chronic arteriovenous shunt: evaluation of a model for heart failure in rat. *Am. J. Physiol.*, 236:H698–H704.
71. Florini, J. R., and Dankberg, F. L. (1971): Changes in ribonucleic acid and protein synthesis during induced cardiac hypertrophy. *Biochemistry*, 10:530–535.
72. Fox, A. C., Wikler, N. S., and Reed, G. E. (1965): High energy phosphate compounds in the myocardium during experimental congestive heart failure. Purine and pyrimidine nucleotides creatine and creatine phosphate in normal and in failing hearts. *J. Clin. Invest.*, 44:202–218.
73. Fox, A. C., and Reed, G. E. (1969): Changes in lactate dehydrogenase composition of hearts with right ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.*, 216:1026–1033.
74. Galeone, A., e Dal Santo, G. (1952): Sull'attivita ATPasica (adenosintrifosfatasica) del cuore nigli stati di insufficienza miocardica. *Minerva Med.*, 1:3–20.
75. Garlick, P. J., Millward, D. J., James, W. P. T., and Waterlow, J. C. (1975): The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 414:71–84.
76. Gelband, H., and Bassett, A. L. (1973): Depressed transmembrane potentials during experimentally induced ventricular failure in cats. *Circ. Res.*, 32:625–633.
77. Gertler, M. M. (1959): Production of experimental congestive failure in the guinea pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 102:396–397.
78. Gertler, M. M., Murakami, K., and Guthrie, R. G. (1966): Oxidative phosphorylation in normal and failure liver, kidney and heart mitochondria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121:657–670.
79. Gibbs, C. L., and Chapman, J. B. (1979): Cardiac energetics. In: *Handbook of Physiology. 2. The Cardiovascular System I. The heart*, edited by R. M. Berne, pp. 775–804. Am. Physiology Soc., Bethesda.
80. Gibson, K., and Harris, P. (1968): Some properties of human myocardial microsomal (Na^-K^-)-ATPase. *Cardiovasc. Res.*, 2:367–370.
81. Gibson, K., and Harris, P. (1970): The distribution of microsomal (Na^-, K^-)-ATPase in the rat heart and the effect of induced right ventricular hypertrophy and feeding with digitalis, sodium, and potassium. *Cardiovasc. Res.*, 4:6–13.
82. Gillis, J. M. (1977): Le couplage excitation-contraction dans la fibre musculaire squelettique et cardiaque. *J. Physiol. (Paris)*, 73:863–876.
83. Goldstein, M. A. (1974): Nuclear pores in ventricular muscle cells from adult hypertrophied hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6:227–235.
84. Grande, F., and Taylor, H. L. (1965): Adaptative change in the heart, vessels and patterns of control under chronically high loads. In: *Handbook of Physiology. 2. Circulation. III*, edited by W. F. Hamilton, pp. 2615–2623. Physiology Soc., Washington.
85. Grimm, A. F., Kubota, R., and Whitehorn, W. V. (1963): Properties of myocardium in cardiomegaly. *Circ. Res.*, 12:118–124.
86. Grimm, A. F., Kubota, R., and Whitehorn, W. V. (1966): Ventricular nucleic acid and protein levels with myocardial growth and hypertrophy. *Circ. Res.*, 19:552–558.
87. Grossman, W. (1980): Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process. *Am. J. Med.*, 69:576–584.
88. Grove, D., Nair, K. G., and Zak, R. (1969): Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. III. Changes in DNA content: the relative contributions of polyploidy and mitotic activity. *Circ. Res.*, 25:463–471.
89. Grove, D., Zak, R., Nair, G., and Aschenbrenner, V. (1969): Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. IV. Observations on the cellular organization of growth during myocardial hypertrophy in the rat. *Circ. Res.*, 25:473–485.
90. Gudbjarnason, S., Telerman, M., and Bing, R. J. (1964): Protein metabolism in cardiac hypertrophy and heart failure. *Am. J. Physiol.*, 206:294–298.
91. Gülch, R. W. (1980): The effect of elevated chronic loading on the action potential of mammalian myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12:415–420.
92. Gunning, J. F., Cooper, G., and Coleman, (1973): Myocardial oxygen consumption in experimental hypertrophy and congestive heart failure due to pressure overload. *Am. J. Cardiol.*, 32:427–436.
93. Hammond, G. L., Wieben, E., and Marker, C. L. (1979): Molecular signals for initiating protein synthesis in organ hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:2455–2459.
94. Hamrell, B. B., and Alpert, N. R. (1977): The mechanical characteristics of hypertrophied rabbit cardiac muscle in the absence of congestive heart failure: the contractile and series elastic elements. *Circ. Res.*, 40:20–25.

95. Harigaya, S., and Schwartz, A. (1968): Isolation and characteristics of a highly active cardiac relaxing system: normal and failing tissues. *Circulation*, 37–38(suppl. IV) 94.
96. Harigaya, S., and Schwartz, A. (1969): Rate of calcium binding and uptake in normal animal and failing human cardiac muscle. Membrane vesicles (relaxing system) and mitochondria. *Circ. Res.*, 25:781–794.
97. Hatt, P. Y., Ledoux, L., and Bonvalet, J. P. (1965): Lyse et synthèse des proteines myocardiques au cours de l'insuffisance cardiaque expérimentale. *Arch. Mal. Coeur. Vx*, 58:1703–1721.
98. Hatt, P. Y., Berjal, G., Moravec, J., and Swynghedauw, B. (1970): Heart failure: an electron microscopic study of the left ventricular papillary muscle in aortic insufficiency in the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1:235–247.
99. Hatt, P. Y. (1977): Cellular changes in mechanically overloaded heart. *Basic Res. Cardiol.*, 72:198–202.
100. Hatt, P. Y., Rakusan, K., Gastineau, P., and Laplace, M. (1979): Morphometry and ultrastructure of heart hypertrophy induced by chronic volume overload (aorto-cava fistula in the rat). *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11:989–998.
101. Hearn, K., Gibson, K., and Harris, P. (1981): The frequency distribution of myocardial ribosomal populations under conditions of cardiac hypertrophy and atrophy. *Symposium on Biology of Heart Hypertrophy*. Burlington (USA) June 13–23.
102. Heilmann, C., Lindl, T., Müller, W., and Pette, D. (1980): Characterization of cardiac microsomes from spontaneously hypertonic rats. *Basic Res. Cardiol.*, 75:92–96.
103. Henquell, L., Odoroff, C. L., and Honig, C. R. (1977): Intercapillary distance and capillary reserve in hypertrophied rat hearts beating *in situ*. *Circ. Res.*, 41:400–408.
104. Henry, P. D., Almmada, G. G., Friedman, N. F., and Sobel, B. C. (1972): Simultaneously measured isometric tension and ATP hydrolysis in glycerinated fiber from normal and hypertrophied rabbit heart. *Circ. Res.*, 31:740–749.
105. Hjalmarson, A., and Isaksson, O. (1972): *In vitro* work load and rat heart metabolism. I. Effect on protein synthesis. *Acta Physiol. Scand.*, 86:126–144.
106. Hjalmarson, A., and Isaksson, O. (1972): *In vitro* load and rat heart metabolism. III. Effect on ribosomal aggregation. *Acta Physiol. Scand.*, 86:342–352.
107. Hoh, J. F. Y., McGrath, P. A., and Hale, P. T. (1977): Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effects of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10:1053–1076.
108. Holland, W. C., and Klein, R. L. (1960): *Chemistry of heart failure*. C. C. Thomas, Springfield. USA.
109. Houser, S. R., Freeman, A. R., Joeger, J. M., Breisch, E. A., Coulson, R. L., Carey, R., and Spann, J. F. (1981): Resting potential changes associated with Na-K pump in failing heart muscle. *Am. J. Physiol.*, 240:H168–H176.
110. Huber, D., Grimm, J., Koch, R., and Krayenbuehl, H. P. (1981): Determinants of ejection performance in aortic stenosis. *Circulation*, 64:126–134.
111. Hudson, R. E. B. (1978): The pathology of heart failure. In: *The Heart*, edited by J. W. Hurst, pp. 528–550. McGraw Hill, New York.
112. Huxtable, R. (1976): Metabolism and function of taurine in the heart. In: *Taurine*, edited by R. Huxtable, and A. Barbeau, pp. 99–119. Raven Press, New York.
113. Huxtable, R., Chubb, J., and Bressler, R. (1975): Changes in taurine concentration in heart and skeletal muscle during atrophy and hypertrophy. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 18:101–105.
114. Huxtable, R., and Chubb, J. (1977): Adrenergic stimulation of taurine transport by the heart. *Science*, 198:409–411.
115. Iavich, M. P., Lerman, M. I., and Meerson, F. Z. (1976): *In vitro* incorporation of labelled amino acids into heart muscle ribosomes at early and late stages of compensatory heart hyperfunction. *Biokhimiia*, 41:2110–2118.
116. Ingwall, J. S., and Wildenthal, K. (1976): Role of creatine in the regulation of cardiac protein synthesis. *J. Cell Biol.*, 68:159–163.
117. Ito, Y., Matsumoto, S., Kaku, I., and Koizumi, T. (1969): Protein and nucleic acids of rabbit heart muscle in experimentally produced cardiac hypertrophy and failure. *Isr. J. Med. Sci.*, 5:501–505.
118. Ito, Y., Suko, J., and Chidsey, C. A. (1974): Intracellular calcium and myocardial contractility. V. Calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 6:237–247

119. Jacob, R., and Kissling, B. (1981): Left ventricular dynamics and myocardial function in Goldblatt hypertension in the rat. Biochemical, morphological and electrophysiological correlates. In: *The Heart in Hypertension*, edited by B. E. Strauer, pp. 89–107. Springer Verlag, Berlin.
120. Jørgensen, P. L., and Skou, J. C. (1971): Purification and characterization of ($Na^+ + K^+$)-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of ($Na^+ + K^+$) ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, 233:366–380.
121. Jouannot, P., Gourdier, B., and Hatt, P. Y. (1973): L'hypertrophie cardiaque expérimentale du rat. *Arch. Mal. Coeur Vx*, 66:1067–1076.
122. Jouannot, P., and Hatt, P. Y. (1975): Rat myocardial mechanics during pressure-induced hypertrophy development and reversal. *Am. J. Physiol.*, 229:355–364.
123. Kako, K. J., Varma, K., and Beznak, M. (1972): RNA synthesis and RNA content of nuclei prepared from hearts during hypertrophy. *Cardiovasc. Res.*, 6:57–66.
124. Katz, A. M., and Repke, D. I. (1967): Quantitative aspects of dog cardiac microsomal calcium binding and calcium uptake. *Circ. Res.*, 21:153–162.
125. Katz, A. I., and Epstein, F. H. (1968): Physiologic role of sodium potassium activated adenosine triphosphatase in the transport of cation across biologic membranes. *N. Engl. J. Med.*, 278:253–261.
126. Katz, A. M. (1973): Biochemical "defect" in the hypertrophied and failing heart. *Circulation*, 47:1076–1079.
127. Katz, A. M., Repke, D. I., Fudyma, G., and Shigekawa, M. (1977): Calcium efflux from sarcoplasmic reticulum vesicles. In: *Calcium-Binding Proteins and Calcium Function*, edited by R. H. Wasserman, pp. 147–154. North Holland.
128. Kaufmann, R. L., Homburger, H., and Wirth, H. (1971): Disorder in excitation-contraction coupling of cardiac muscle from cats with experimentally produced right ventricular hypertrophy. *Circ. Res.*, 28:346–357.
129. Khatter, J. C., and Prasad, K. (1976): Myocardial sarcolemnal ATPase in dogs with induced mitral insufficiency. *Cardiovasc. Res.*, 10:637–641.
130. Kidwai, A. M., Radcliffe, M. A., Duchon, G., and Daniel, E. E. (1971): Isolation of plasma membrane from cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 45:901–910.
131. Kissling, G., Gassenmaier, T., Wendt-Gallitelli, M. F., and Jacob, R. (1977): Pressure-volume relations, elastic modulus and contractile behaviour of the hypertrophied left ventricle of rats with Goldblatt II hypertension. *Pflugers Arch.*, 369:213–221.
132. Klotz, C., Swynghedauw, B., Mendes, H., Marotte, F., and Leger, J. J. (1981): Evidence for new forms of cardiac myosin heavy chains in mechanical heart overloading and aging. *Eur. J. Biochem.*, 115:415–421.
133. Koide, T., and Rabinowitz, M. (1969): Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. II. Increased rate of RNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.*, 24:9–18.
134. Kolbel, F., Mommaerts, W. F. H. M., and Kolblova, V. (1968): Ribosomy srdečního svalu v časné fázi vývoje pokusné srdeční hypertrofie. *Sborn. Lék.*, 70:142–147.
135. Kopp, S. J., and Barany, M. (1970): Phosphorylation of the 19,000-dalton light chain of myosin in perfused rat heart under the influence of negative and positive inotropic agents. *J. Biol. Chem.*, 254:12007–12012.
136. Krelhaus, W., Gibson, K., and Harris, P. (1975): The effects of hypertrophy, hypobaric conditions and diet on myocardial decarboxylase activity. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7:63–69.
137. Kuhn, H., Pfitzer, P., and Stoepel, K. (1974): DNA content and DNA synthesis in the myocardium of rats after induced renal hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 8:86–91.
138. Lacombe, G., Thiem, N. V., and Swynghedauw, B. (1981): Modification of myosin subfragment 1 by carbodiimide in the presence of a nucleophile. *Biochemistry*, 20:3648–3653.
139. Lamers, J. M. L., Stinis, J. T., Kort, W. J., and Hülsmann, W. C. (1978): Biochemical studies on the sarcolemnal function in the hypertrophied rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10:235–248.
140. Lamprecht, W. (1967): Substrate and energy metabolism in heart failure. *Int. Symp. on the coronary circulation and energetics of the myocardium*, pp. 186–199. Karger, Basel, N.Y.
141. Laurent, G. J., and Millward, D. J. (1980): Protein turnover during skeletal muscle hypertrophy. *Fed. Proc.*, 39:42–47.
142. Lecarpentier, Y., Chuck, L. H. S., Housmans, P. R., de Clerck, N. M., and Brutsaert, D. L. (1979): Nature of load dependence of relaxation in cardiac muscle. *Am. J. Physiol.*, 237:H455–460.

ARTICLE 6

143. Lecarpentier, Y., Martin, J. L., Gastineau, P., Orszag, A., and Hatt, P. Y. (1980): Mammalian heart relaxation during cardiac hypertrophy. *8th European Congress of Cardiology Paris* June 22–26. Abstract 1286.
144. Leclercq, J. F., and Swynghedauw, B. (1976): Myofibrillar ATPase, DNA, and hydroxyproline content of human hypertrophied heart. *Eur. J. Clin. Invest.*, 6:27–33.
145. Leclercq, J. F., Sebag, C., and Swynghedauw, B. (1978): Experimental cardiac hypertrophy in rabbits after aortic stenosis or incompetence or both. *Biomedicine*, 28:180–184.
146. Leger, J., Bouveret, P., Schwartz, K., and Swynghedauw, B. (1976): A comparative study of skeletal and cardiac tropomyosins. Subunits, thiol group content and biological activities. *Pflugers Arch.*, 362:271–277.
147. Leger, J. J., Berson, G., Delcayre, C., Klotz, C., Schwartz, K., Leger, J., Stephens, M., and Swynghedauw, B. (1975): Heart contractile proteins. *Biochimie (Paris)*, 57:1249–1273.
148. Lelievre, L. G., Mansier, P., Preteseille, M., Berson, G., and Swynghedauw, B. Isolation of impermeable inside-out vesicles from an enriched sarcolemma fraction of rat heart. To be published.
149. Lentz, R. W., Harrison, C. E. Jr., Devey, J. D., Barnhorst, D. A., Danielson, G. K., and Pluth, J. R. (1978): Functional evaluation of cardiac sarcoplasmic reticulum and mitochondria in human pathologic states. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 10:3–30.
150. Le Peuch, C., Guilleux, J. C., and Demaille, J. G. (1980): Dual phosphorylation of phospholamban by cAMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent protein kinases: an *in vivo* study. *Congrés Soc. Chimie Biol.*, Abstract p. 31.
151. Levine, H. J., and Wagman, R. J. (1962): Energetics of the human heart. *Am. J. Cardiol.*, 9:372–383.
152. Lewinter, M. M., Engler, R. L., and Karliner, J. S. (1980): Enhanced left ventricular shortening during chronic volume overload in conscious dogs. *Am. J. Physiol.*, 238:H126–H133.
153. Limas, C., and Limas, C. J. (1978): Reduced number of β-adrenergic receptors in the myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83:710–714.
154. Limas, C. J. (1979): Increased number of β-adrenergic receptors in the hypertrophied myocardium. *Biochem. Biophys. Acta*, 588:174–178.
155. Limas, C. J. (1980): Effects of phospholipid methylation on β-adrenergic receptors in the normal and hypertrophied rat myocardium. *Circ. Res.*, 47:536–541.
156. Limas, C. J., and Spier, S. S. (1980): Effect of antihypertensive therapy on calcium transport by cardiac sarcoplasmic reticulum of SHRs. *Cardiovasc. Res.*, 14:692–699.
157. Lindenmayer, G. E., Sordahl, L. A., and Schwartz, A. (1968): Reevaluation of oxydative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. *Circ. Res.*, 23:439–450.
158. Linzbach, A. J. (1960): Heart failure from the point of view of quantitative anatomy. *Am. J. Cardiol.*, 5:370–381.
159. Litten, Z., Brayden, J. E., and Alpert, N. R. (1978): The ATPase activity of subfragment-1 from the hypertrophied heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 523:377–384.
160. Lompré, A. M., Schwartz, K., D'Albis, A., Lacombe, G., Thiem, N. V., and Swynghedauw, B. (1979): Myosin isozymes redistribution in chronic heart overloading. *Nature*, 282:105–107.
161. Lompré, A. M., Mercadier, J. J., Wisnewski, C., Bouveret, P., Pantaloni, C., D'Albis, A., and Schwartz, K. (1981): Species- and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Dev. Biol.*, 84:286–290.
162. Martin, A. F., Reddy, M. K., Zak, R., Dowell, R. T., and Rabinowitz, M. (1974): Protein metabolism in hypertrophied heart muscle. *Circ. Res.*, 34–35 suppl. III:32–40.
163. Martin, A. F., Rabinowitz, M., Blough, R., Prior, G., and Zak, R. (1977): Measurements of half-life of rat cardiac myosin heavy chain with leucyl-tRNA as precursor pool. *J. Biol. Chem.*, 252:3422–3429.
164. Martin Del Molino, A., and Cabezas, J. A. (1979): Comparative results on sarcolemnal membrane preparations obtained by three procedures. *Int. J. Biochem.*, 10:895–900.
165. Matsui, H., and Schwartz, A. (1966): Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na^+, K^+-dependent adenosine triphosphatase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, 128:380–390.
166. Matsushita, S., and Fanburg, B. L. (1970): Pyrimidine nucleotide synthesis in the normal and hypertrophying rat heart. *Circ. Res.*, 27:415–428.
167. Maughan, D., Low, E., Ritten, R. III, Brayden, J., and Alpert, N. (1979): Calcium-activated muscle from hypertrophied rabbit hearts: mechanical and correlated biochemical changes. *Circ. Res.*, 44:279–288.

ARTICLE 6

168. Mayr, G. W., Bürger, S., and Strauer, B. E. (1981): Properties of myocardial myosin in left ventricular hypertrophy due to spontaneous essential hypertension in rats. In: *The Heart in Hypertension*, edited by B. E. Strauer, pp. 131–141. Springer Verlag, Berlin.
169. Mead, R. J., Peterson, M. B., and Welty, J. D. (1971): Sarcolemmal and sarcoplasmic reticular ATPase activities in the failing canine heart. *Circ. Res.*, 29:14–20.
170. Meerson, F. Z., Alekhina, G. M., Aleksandrov, P. N., and Bazadjan, A. G. (1968): Dynamics of nucleic acid and protein synthesis of the myocardium in compensatory hyperfunction and hypertrophy of the heart. *Am. J. Cardiol.*, 22:337–347.
171. Meerson, F. Z. (1969): The myocardium in hyperfunction hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.*, 25 suppl. II.
172. Meerson, F. Z., Javich, M. P., and Podobed, O. V. (1981): Metabolism of poly (A)-containing mRNA in myocardium under normal physiological conditions and compensatory cardiac hyperfunction. *Basic Res. Cardiol.*, 76:124–135.
173. Mercadier, J. J., Lompré, A. M., Wisnewsky, C., Samuel, J. L., Bercovici, J., Swynghedauw, B., and Schwartz, K. (1981): Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 49:525–532.
174. Minton, P. R., Zoll, P. M., and Norman, L. R. (1960): Levels of phosphate compounds in experimental cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 8:924–929.
175. Moalic, J. M., Bercovici, J., and Swynghedauw, B. (1981): Protein synthesis in systolic and diastolic overloading in rat. A comparative study. *Cardiovasc. Res.*, 15:515–521.
176. Moravec, J. (1980): Intra-cellular oxygen utilization in mechanically overloaded rat heart. *Basic Res. Cardiol.*, 75:193–198.
177. Moravec, J. (1980): Possible relationship between tissue level of long chain Acyl-CoA and the ability of the overloaded myocardium to oxidize an excess of reduced pyridine nucleotide. *FEBS Lett.*, 113:134–137.
178. Morgan, H. E., Rannels, D. E., and Kao, R. L. (1974): Factors controlling protein turnover in heart muscle. *Circ. Res.*, 34 and 35 supp. III:22–31.
179. Morkin, E., and Ashford, T. P. (1968): Myocardial DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.*, 215:1409–1413.
180. Morkin, E., Kimata, S., and Skillman, J. J. (1972): Myosin synthesis and degradation during development of cardiac hypertrophy in the rabbit. *Circ. Res.*, 30:690–702.
181. Morkin, F. (1974): Activation of synthetic processes in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 35 supp. II:37–48.
182. Moroz, L. A. (1967): Protein synthetic activity of heart microsomes and ribosomes during left ventricular hypertrophy in rabbits. *Circ. Res.*, 21:449–459.
183. Nagl, W. (1978): *Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution*. North Holland.
184. Nair, K. G., Cutilletta, F., Zak, R., Koide, T., and Rabinowitz, M. (1968): Biochemical correlates of cardiac hypertrophy. I. Experimental model: changes in heart weight, RNA content and nuclear RNA polymerase activity. *Circ. Res.*, 23:451–462.
185. Nayler, W. G., McInnes, I., Chipperfield, D., Carson, V., and Kurtz, J. B. (1970): Ventricular function and the calcium accumulating activity of the sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1:307–324.
186. Novi, A. M. (1968): Beitrag zur Feinstruktur des Herzmuskels bei experimenteller Herzhypertrophie. *Beitr. Path. Anat.*, 137:19–50.
187. Olson, R. E. (1964): Abnormalities of myocardial metabolism. *Circ. Res.*, 14 and 15 (suppl. II), 109.
188. Opie, L. H. (1968): Metabolism of the heart in health and disease, I. *Am. Heart J.*, 76:685–698.
189. Page, E., Polimeni, P. I., Zak, R., Earley, J., and Johnson, M. (1972): Myofibrillar mass in rat and rabbit heart muscle. Correlation of microchemical and stereological measurements in normal and hypertrophic hearts. *Circ. Res.*, 30:430–439.
190. Pannier, J. L. (1971): Contractile state of papillary muscles obtained from cats with moderate cardiac hypertrophy. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 79:743–752.
191. Peters, T. J., Wells, G., Brooksby, I. A. B., Jenkins, B. S., Webb-Peploe, M. M., and Coltart, D. J. (1976): Enzymic analysis of cardiac biopsy material from patients with valvular heart disease. *Lancet*, 1:269–270.
192. Peters, T. J., Wells, G., Oakley, C. M., Brooksby, I. A. B., Jenkins, B. S., Webb-Peploe, M. M., and Coltart, D. J. (1977): Enzymic analysis of endo-myocardial biopsy specimens from patients with cardiomyopathies. *Br. Heart J.*, 39:1333–1339.

ARTICLE 6

193. Peterson, M. B., and Lesch, M. (1972): Protein synthesis and amino acid transport in the isolated rabbit right ventricular papillary muscle. Effect of isometric tension development. *Circ. Res.*, 31:317–327.
194. Peterson, M. B., Mead, R. J., and Welty, J. D. (1973): Free amino acids in congestive heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 5:139–147.
195. Pfeffer, M. A., Pfeffer, J. M., Dunn, F. G., Nishiyama, K., Tsuchiya, M., and Frohlich, E. D. (1979): Natural biventricular hypertrophy in normotensive rats. I. Physical and hemodynamic characteristics. *Am. J. Physiol.*, 236:H640–H643.
196. Pinsky, W. W., Lewis, R. M., Hartley, C. J., and Entman, M. L. (1979): Permanent changes of ventricular contractility and compliance in chronic volume overload. *Am. J. Physiol.*, 237:H575–H583.
197. Pool, P. E., and Seagren, S. C. (1966): Restoration of the reduced high-energy phosphate stores in experimental heart failure. *Circulation*, 33 and 34: suppl. III, 190.
198. Pool, P. E., Chandler, B. M., Sonnenblick, E. H., and Braunwald, E. (1968): Integrity of energy stores in cat papillary muscle. Effect of changes in temperature and frequency of contraction on high energy phosphate stores. *Circ. Res.*, 22:213–219.
199. Posner, B. I., and Fanburg, B. L. (1968): Ribonucleic acid synthesis in experimental cardiac hypertrophy in rats. II. Aspects of regulation. *Circ. Res.*, 23:137–145.
200. Prasad, K., Khatter, J. C., and Bharadway, B. (1979): Intra- and extracellular electrolytes and sarcolemmal ATPase in the failing heart due to pressure overload in dogs. *Cardiovasc. Res.*, 13:95–104.
201. Price, K. M., Littler, W. A., and Cummins, P. (1980): Myosin adenosinetriphosphatase activity and light chain subunit composition of human right and left ventricle. *Cardiovasc. Res.*, 14:555–560.
202. Rajamanickam, C., Merten, S., Kwiatkowska-Patzer, B., Chuang, C., Zak, R., and Rabinowitz, M. (1979): Changes in mitochondrial DNA in cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.*, 45:505–515.
203. Ray, A. (1981): Metabolisme des acides ribonucléiques ribosomiques du coeur de mammifère. Thèse de Sciences. Université de Grenoble (France).
204. Revis, N. W., Thompson, R. Y., and Cameron, A. J. V. (1977): Lactate dehydrogenase isoenzymes in the human hypertrophic heart. *Cardiovasc. Res.*, 11:172–176.
205. Revis, N. W., and Cameron, A. J. V. (1978): The relationship between fibrosis and lactate dehydrogenase isoenzymes in experimental hypertrophic heart of rabbits. *Cardiovasc. Res.*, 12:348–357.
206. Ross, J. Jr., and McCullagh, W. H. (1972): Nature of enhanced performance of the dilated left ventricle in the dog during chronic volume overloading. *Circ. Res.*, 30:549–556.
207. Ross, J. (1974): Adaptations of the left ventricle to chronic overload. *Circ. Res.*, 34–35 suppl. II, 64–70.
208. Rossi, A. (1975): 32P labelling of the nucleotides in α position in the rabbit heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7:891–906.
209. Rumyantsev, P. P., and Kassem, A. M. (1976): Cumulative indices of DNA synthesizing myocytes in different compartments of the working myocardium and conductive system of the rat's heart muscle following extensive left ventricle infarction. *Virchows Arch. Biol. Cell. Path.*, 20:329–342.
210. Sartore, S., Pierobon-Bormioli, S., Schiaffino, S. (1978): Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart. *Nature*, 274:82–83.
211. Scheuer, J., and Bhan, A. K. (1979): Cardiac contractile proteins. Adenosine Triphosphatase activity and physiological function. *Circ. Res.*, 45:1–12.
212. Schreiber, S. S., Oratz, M., and Rothschild, M. A. (1967): Effect of acute overload on protein synthesis in cardiac muscle microsomes. *Am. J. Physiol.*, 213:1552–1555.
213. Schreiber, S. S., Oratz, M., Evans, C., Silver, E., and Rothschild, M. A. (1968): Effects of acute overload on cardiac muscle mRNA. *Am. J. Physiol.*, 215:1250–1259.
214. Schreiber, S. S., Oratz, M., and Rothschild, M. A. (1969): Nuclear RNA polymerase activity in acute hemodynamic overload in the perfused heart. *Am. J. Physiol.*, 217:1305–1309.
215. Schreiber, S. S., Oratz, M., Evans, C. D., Gueyikian, I., and Rothschild, M. A. (1970): Myosin, myoglobin, and collagen synthesis in acute cardiac overload. *Am. J. Physiol.*, 219:481–486.
216. Schreiber, S. S., Oratz, M., Evans, C., Reff, F., Klein, I., and Rothschild, M. A. (1973): Cardiac protein degradation in acute overload *in vitro*: reutilization of amino acids. *Am. J. Physiol.*, 224:338–345.

217. Schreiber, S. S., Rothschild, M. A., Evans, C., Reff, F., and Oratz, M. (1975): The effect of pressure or flow stress on right ventricular protein synthesis in the face of constant and restricted coronary perfusion. *J. Clin. Invest.*, 55:1–11.
218. Schreiber, S. S., Oratz, M., Rothschild, M. A., and Reff, F. (1978): Effect of hydrostatic pressure on isolated cardiac nuclei: stimulation of RNA polymerase II activity. *Cardiovasc. Res.*, 12:265–268.
219. Schreiber, S. S., Evans, C. D., Oratz, M., and Rothschild, M. A. (1981): Protein synthesis and degradation in cardiac stress. *Circ. Res.*, 48:601–611.
220. Schreiber, V., Kölbel, F., Stepán, J., Gregorovà, S. I., and Puribyl, T. (1981): Digoxin-like immunoreactivity in the serum of rats with cardiac overloading. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 13:107–110.
221. Schwartz, A., and Lee, K. S. (1962): Study of heart mitochondria and glycolytic metabolism in experimentally induced cardiac failure. *Circ. Res.*, 10:321–332.
222. Schwartz, A., Sordahl, L. A., Intman, M. L. et al. (1973): Abnormal biochemistry in myocardial failure. *Am. J. Cardiol.*, 32:407–422.
223. Schwartz, A., Lindenmayer, G. E., and Allen, J. C. (1975): The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, 27:3–134.
224. Schwartz, F., Kittstein, D., Winkler, B., and Schaper, J. (1980): Quantitative ultrastructure of the myocardium in chronic aortic valve disease. *Basic Res. Cardiol.*, 75:109–117.
225. Schwartz, K., Bouveret, P., Sebag, C., Léger, Joc., and Swynghedauw, B. (1977): Immunoemical evidence for the species-specificity of mammalian cardiac myosin and heavy meromyosin. *Biochim. Biophys. Acta*, 425:24–36.
226. Schwartz, K., Bouveret, P., Bercovici, J., and Swynghedauw, B. (1978): An immunochemical difference between myosins from normal and hypertrophied rat hearts. *FEBS Lett.*, 93:137–140.
227. Selye, N. (1970): *Experimental Cardiovascular Diseases*. Vols. I and II. Springer Verlag, Berlin.
228. Sen, S., Tarazi, R. C., Khairallah, P. A., and Bumpus, M. F. (1974): Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.*, 35:775–781.
229. Shahab, L., and Wollenberger, A. (1970): Amino acid incorporation into mitochondria from hypertrophying hearts of rats with aortic constriction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1:143–155.
230. Siemankowski, R. F., and Dreizen, P. (1978): Canine cardiac myosin with special reference to pressure overload cardiac hypertrophy. II. Myosin ATPase. *J. Biol. Chem.*, 253:8659–8665.
231. Skosey, J. L., Zak, R., Martin, A. F., Aschenbrenner, V., and Rabinowitz, M. (1972): Biochemical correlates of cardiac hypertrophy—V. Labeling of collagen, myosin and nuclear DNA during experimental myocardial hypertrophy in the rat. *Circ. Res.*, 31:145–157.
232. Sobel, B. E., Spann, J. F. Jr., Pool, P. E., Sonnenblick, E. H., and Braunwald, E. (1967): Normal oxidative phosphorylation in mitochondria from the failing heart. *Circ. Res.*, 21:355–363.
233. Sobel, B. E., Henry, P. D., Ehrlich, B. J., and Bloor, C. M. (1970): Altered myocardial lactic dehydrogenase isoenzymes in experimental cardiac hypertrophy. *Lab. Invest.*, 22:23–27.
234. Sonnenblick, E. H. (1962): Force velocity relations in mammalian heart muscle. *Am. J. Physiol.*, 205:931–939.
235. Sordahl, L. A., Wood, W. G., and Schwartz, A. (1970): Production of cardiac hypertrophy and failure in rabbits with ameroid clips. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1:341–344.
236. Sordahl, L. A., McCollum, W. B., Wood, W. F., and Schwartz, A. (1973): Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Am. J. Physiol.*, 224:497–502.
237. Spann, J. F. Jr., Buccino, R. A., and Sonnenblick, E. H. (1967): Production of right ventricular hypertrophy with and without congestive heart failure in the cat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125:522–524.
238. Spann, J. F. Jr., Covell, J. W., Eckberg, D. L., Sonnenblick, E. H., Ross, J. Jr., and Braunwald, E. (1972): Contractile performance of the hypertrophied and chronically failing cat ventricle. *Am. J. Physiol.*, 223:1150–1157.
239. Sperelakis, N. (1979): Origin of the cardiac resting potential. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System I. The Heart*, edited by R. M. Berne, pp. 187–267. American Physiological Society, Bethesda.
240. Stabilini, R., Fiorelli, G., Radice, F., Marinari, M., and Agostini, A. (1970): Lactate dehydrogenase and aspartate amino-transferase isoenzymes in normal and hypertrophic human heart. *Cardiology*, 55:28–33.

ARTICLE 6

241. Stam, A. C. Jr., Weglicki, W. B. Jr., Feldman, D., Shelburne, J. C., and Sonnenblick, E. H. (1970): Canine myocardial sarcolemna. Its preparation and enzymic activity. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1:117–130.
242. Stephens, M., Léger, J. J., Preteseille, M., and Swynghedauw, B. (1979): Synthesis of cardiac myofibrils after aortic coarctation: effect of destenosis and of aortic incompetence. *Pathol. Biol.*, 27:41–44.
243. Stewart, P. S., and Lindsay, H. A. (1967): Simulated aortic or pulmonary stenosis in the rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125:363–367.
244. Stoner, C. D., Ressallat, M. M., and Sirak, H. D. (1968): Oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from chronically stressed dog hearts. *Circ. Res.*, 23:87–97.
245. Strauer, B., and Tauchert, M. (1973): Evidence for an inefficient energy utilization in cardiac hypertrophy. Study on the isolated human ventricular myocardium. *Klin. Wochenschr.*, 51:322–326.
246. Suko, J., Vogel, J. H. K., and Chidsey, C. A. (1970): Intracellular calcium and myocardial contractility. III. Reduced calcium uptake and ATPase of the sarcoplamic reticular fraction prepared from chronically failing calf hearts. *Circ. Res.*, 27:235–247.
247. Swynghedauw, B., Courtault, D., and Wanstock, F. (1968): L'hypertrophie cardiaque expérimentale chez le rat. *Pathol. Biol.*, 16:691–694.
248. Swynghedauw, B., Bouveret, P., Durand, M., Hatt, P. Y., Lemaire, F., and Piguet, V. (1971): Myofibrillar and actomyosin ATPase in experimental aortic insufficiency. *Cardiovasc. Res.*, 5:458–468.
249. Swynghedauw, B., Bouveret, P., and Hatt, P. Y. (1973): New fractionation scheme for preparation of heart particles. ATPase activity of purified myofibrils in chronic aortic insufficiency in the rabbit. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 5:441–459.
250. Swynghedauw, B., Klotz, C., Leger, J. J., and Preteseille, M. (1973): Heart myosin adenosine triphosphatase and light subunits in experimental rabbits chronic aortic insufficiency. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 5:501–514.
251. Swynghedauw, B., Leger, J. J., and Schwartz, K. (1976): The myosin isozyme hypothesis in chronic heart overloading. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 8:915–924.
252. Syrovy, I., Delcayre, C., and Swynghedauw, B. (1979): Comparison of ATPase activity and light subunits in myosins from left and right ventricles and atria in seven mammalian species. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11:1129–1135.
253. Takala, T. (1981): Protein synthesis in the isolated perfused heart. Effects of mechanical work load, diastolic ventricular pressure and coronary pressure on amino acid incorporation and its transmural distribution into left ventricular protein. *Basic Res. Cardiol.*, 76:44–61.
254. Trithart, H., Luedke, H., Bayer, R., Stierle, H., and Kaufmann, R. (1975): Right ventricular hypertrophy in the cat, an electrophysiological and anatomical study. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 7:163–174.
255. Turto, H. (1977): Experimental cardiac hypertrophy and the synthesis of poly (A) containing RNA and of myocardial proteins in the rat: the effect of digoxin treatment. *Acta Physiol. Scand.*, 101:144–154.
256. Valadares, J. R. E., Singhai, R. L., Parulekar, M. R., and Beznak, M. (1969): Influence of aortic coarctation on myocardial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 47:388–391.
257. Van Den Bos, G. C., Elzinga, G., Westerhof, N., and Noble, M. I. M. (1973): Problem in the use of indices of myocardial contractility. *Cardiovasc. Res.*, 7:834–848.
258. Vandenburgh, H., and Kaufman, S. (1979): *In vitro* model for stretch-induced hypertrophy of skeletal muscle. *Science*, 203:265–268.
259. Villani, F. P., Pelosi, G., Agliati, G., Piccinini, F., and Pensa, P. (1976): Calcium exchangeable fraction of sarcoplasmic reticulum in hypertrophic dog heart. *Pharmacology*, 14:140–147.
260. Walsh, D. A., Clippinger, M. S., Sivaramakrishnan, S., and McCullough, T. E. (1979): Cyclic adenosine monophosphate dependent and independent phosphorylation of sarcolemma membrane proteins in perfused rat heart. *Biochemistry*, 18:871–877.
261. Wang, T., Grossi de Gende, A. O., and Schwartz, A. (1979): Kinetics properties of calcium adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum isolated from cat skeletal muscles. A comparison of caudofemolaris (fast), tibialis (mixed) and soleus (slow). *J. Biol. Chem.*, 254:10675–10678.
262. Weiss, L., and Lundgren, Y. (1978): Left ventricular hypertrophy and its reversibility in young spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.*, 12:635–638.

263. Welham, K. C., Sileve, E. D., and Wyse, R. K. H. (1978): Experimental right ventricular hypertrophy and failure in swine. *Cardiovasc. Res.*, 12:61–65.
264. Wendt-Gallitelli, M. F., Ebrecht, G., and Jacob, R. (1979): Morphological alterations and their functional interpretation in the hypertrophied myocardium of Goldblatt hypertensive rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11:275–287.
265. Wikman-Coffelt, J., Zelis, R., Fenner, C., and Mason, D. T. (1973): Studies on the synthesis and degradation of light and heavy chains of cardiac myosin. *J. Biol. Chem.*, 248:5206–5207.
266. Wikman-Coffelt, J., Fenner, C., Coffelt, R. J., Salel, A., Kamiyama, T., and Mason, D. F. (1975): Chronological effects of mild pressure overload on myosin activity in canine right ventricle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 7:219–224.
267. Wikman-Coffelt, J., Parmley, W. W., and Mason, D. T. (1979): The cardiac hypertrophy process: analyses of factors determining pathological versus physiological development. *Circ. Res.*, 45:697–707.
268. Will, H., Levchenko, T. S., Levitsky, D. O., Smirnov, V. N., and Wollenberger, A. (1978): Partial characterization of proteins kinase-catalyzed phosphorylation of low molecular weight proteins in purified preparations of pigeon heart sarcolemna and sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, 543:175–193.
269. Willebrands, A. F., Ter Welle, H. F., and Tasseron, S. J. A. (1971): Functional state of mitochondria isolated from failing and from hypertrophic non-failing human hearts. *Clin. Chim. Acta*, 32:251–260.
270. Williams, J. F. Jr., and Potter, R. D. (1974): Normal contractile state of hypertrophied myocardium after pulmonary artery constriction in the cat. *J. Clin. Invest.*, 54:1266–1272.
271. Winegrad, S. (1979): Electromechanical coupling in heart muscle. In: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. I. The Heart*, edited by R. M. Berne, pp. 393–428. American Physiological Society, Bethesda.
272. Wittels, B., and Spann, J. F. Jr. (1968): Defective lipid metabolism in the failing heart. *J. Clin. Invest.*, 47:1787–1794.
273. Wollenberger, A., Kleitke, B., and Schulze, W. (1966): Über den Status der Mitochondr in hypertrophierten Herzen von Hunden mit allmählich entstandener Aorten-Stenose- *Acta Biol. Med. German*, 17:334–342.
274. Wüsten, B., Flameng, W., Winkler, B., and Schaper, W. (1977): Role of cardiac contractility in hypertrophy from chronic volume loading. *Cardiovasc. Res.*, 11:132–140.
275. Yazaki, Y., and Fujii, J. (1972): Depressed Na-K ATPase activity in the failing rabbit heart. *Jpn. Heart J.*, 13:73–83.
276. Yazaki, Y., and Raben, M. S. (1974): Cardiac myosin adenosine triphosphatase of rat and mouse. Distinctive enzymatic properties compared with rabbit and dog cardiac myosin. *Circ. Res.*, 35:15–23.
277. Yin, F. C. P., Spurgeon, H. A., Weisfeldt, M. L., and Lakatta, E. G. (1980): Mechanical properties of myocardium from hypertrophied rat hearts. A comparison between hypertrophy induced by senescence and by aortic banding. *Circ. Res.*, 46:292–300.
278. Zak, R. (1973): Cell proliferation during cardiac growth. *Am. J. Cardiology*, 31:211–219.
279. Zak, R. (1974): Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circ. Res.*, 35 suppl. II:17–26.
280. Zak, R., Martin, A. F., Prior, G., and Rabinowitz, M. (1977): Comparison of turnover of several myofibrillar proteins and critical evaluation of double isotope method. *J. Biol. Chem.*, 252:3430–3435.
281. Zak, R., Martin, A. F., and Blough, R. (1979): Assessment of protein turnover by use of radioisotopic tracers. *Physiol. Rev.*, 59:407–447.
282. Zimmer, H. G., Trendelenburg, C., and Gerlach, E. (1972): Acceleration of adenine nucleotide synthesis *de novo* during development of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol*, 4:279–282.
283. Zimmer, H. G., Steinkopff, G., and Gerlach, E. (1972): Changes of protein synthesis in the hypertrophying heart. *Pflugers Arch.*, 336:311–325.
284. Zimmer, H. G., Steinkopff, G., Ibel, H., and Koschine, H. (1980): Is the ATP decline a signal for stimulating protein synthesis in isoproterenol-induced cardiac hypertrophy? *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12:421–426.
285. Zühlke, V., du Mesnil de Rochemont, W., Gudbjarnason, S., and Bing, R. J. (1966): Inhibition of protein synthesis in cardiac hypertrophy and its relation to myocardial failure. *Circ. Res.*, 18:558–572.

E. CONCLUSION

Dans tous les cas étudiés, la variation de l'activité ATPase de la myosine observée va de pair avec une variation de même sens de la contractilité. C'est également vrai dans une situation pathologique, l'hypertrophie cardiaque induite par surcharge mécanique. La corrélation démontrée entre ATPase de la myosine et contractilité implique que la myosine est un des déterminants biochimiques majeurs des propriétés du muscle cardiaque. Ce résultat est en accord avec les conclusions de Barany (1967) tirées de l'étude du muscle squelettique. Une hypothèse concernant la signification de ces modifications de la myosine est formulée. Elle propose qu'une diminution du rendement énergétique musculaire entraîne une réponse adaptative dont la variation de l'activité enzymatique de la myosine est l'aspect majeur. La synthèse d'une nouvelle myosine dans le coeur sous l'influence de la thyroxine, conclue de ce travail, a été confirmée, par d'autres auteurs, par la séparation d'isoenzymes de la myosine cardiaque. Dans un grand nombre de situations, les variations de l'activité enzymatique de la myosine peuvent être expliquées par une répartition variable de deux isomyosines d'activité enzymatique différente.

Il reste des situations dans lesquelles il faut invoquer un autre mécanisme pour expliquer ces variations, et une modification post-transcriptionnelle de la myosine est une possibilité. Ce travail montre qu'il n'y a pas de relation directe, au cours de l'hypertrophie chronique, entre la variation de l'activité ATPase de la myosine et le niveau de phosphorylation de sa chaîne légère ou l'activité de la myosine kinase. Cette conclusion n'exclut pas, toutefois, la participation du système de phosphorylation de la chaîne légère à l'adaptation cardiaque dans d'autres situations. La présence de la myosine kinase et de la calmoduline, révélée par immunofluorescence dans l'appareil contractile, montre que ce système peut jouer un rôle, qui reste à déterminer.

Une revue sur la biologie des surcharges cardiaques résume les mécanismes mis en jeu dans le coeur pour lui permettre de supporter une surcharge prolongée de travail. Ces mécanismes, dont certains sont décrits plus haut, représentent une adaptation ayant pour résultat une meilleure utilisation de l'énergie par l'appareil contractile.

REFERENCES

ADELSTEIN RS, CONTI AM, ANDERSON W (1973) Proc Natl Acad Sci USA 70, 3115-3118

ADELSTEIN RS, CONTI AM (1975) Nature 26, 597-598

ADELSTEIN RS, CONTI MA, HATHAWAY DR, KLEE CB (1978) J Biol Chem 253, 8347-8350

ADELSTEIN RS, EISENBERG E (1980) Ann Rev Biochem 49, 921-956

ADELSTEIN RS, KLEE CB (1980) Calcium and cell function, Vol 1, calmodulin. CHEUNG WY Ed., Academic Press, New York, 167-182

ADELSTEIN RS, KLEE CB (1981) J Biol Chem 256, 7501-7509

AKSOY MO, WILLIAMS D, SHARKEY EM, HARTSHORNE DJ (1976) Biochem Biophys Res Commun 69, 35-41

d'ALBIS A, GRATZER WB (1973) FEBS Lett 29, 293-296

d'ALBIS A, PANTALONI C, BECHET JJ (1979) Eur J Biochem 99, 261-272

ALEXIS MN, GRATZER WB (1978) Biochemistry 17, 2319-2325

ALLEN DG, BLINKS JR (1978) Nature 273, 509-513

ALPERT NR, GORDON MS, (1962) Amer J Physiol 202, 940-946

ALPERT NR, HAMRELL BB, HALPERN W (1974) Circ Res 34-35, 1171-1182

ALPERT NR, MULIERI LA (1981) The heart in hypertension. STRAUER BE Ed. Springer Verlag, Berlin, 153-163

ALPERT NR, MULIERI LA (1982) Federation Proc 41, 192-198

AMES BN (1966) Methods Enzymol 8, 116-118

AMOS LA, HUXLEY HE, HOLMES KC, GOODY RS, TAYLOR KA (1982) Nature 299, 467-469

ANDERSON JM, CORMIER MJ (1978) Biochem Biophys Res Commun 84, 595-602

BAGSHAW CW, (1977) Biochemistry 16, 59-67

BAGSHAW CR, TRENTHAM DR, (1974) Biochem J 141, 331-349

BAILEY C, VILLAR-PALASI C (1971) Federation Proc 30, 1147

BALINT M, WOLF I, TARCSAFALVI A, GERGELY J, SRETER F (1978) Arch Biochem Biophys 190, 793-799

BANERJEE SK, MORKIN E (1977) Circ Res 41, 630-634

BARANY M, GAETJENS E, BARANY K, KARP E (1964) Arch Biochem Biophys 106, 280-293

BARANY M (1967) J Gen Physiol 50, 197-216
BARANY K, BARANY M (1977) J Biol Chem 252, 4752-4754
BARANY K, BARANY M, GILLIS JM, KUSHMERICK MJ (1979) J Biol Chem 254, 3617-3623
BARANY M, BARANY K (1981) Amer J Physiol 241, H117-128
BARANY K, BARANY M (1982) Biochim Biophys Acta 706, 136-140
BARRON JT, BARANY M, BARANY K, STORTI R (1980) J Biol Chem 255, 6238-6244
BARYLKO B, KUZNICKI J, DRABIKOWSKI W (1978) FEBS Lett 90, 301-304
BECHET JJ, BACHOUCHI N, JANMOT C, D'ALBIS A (1982) Biochim Biophys Acta 703, 54-61
BENDALL JR (1964) Biochemistry of muscular contraction. GERGELY J Ed., Little Brown et Cie, Boston, Mass, 87-98
BERSOHN MM, SCHEUER J (1977) Circ Res 40, 510-516
BERSON GB (1979) Etude de la troponine cardiaque. Thèse de doctorat ès-sciences, Paris XI-Orsay
BERSON G, SWYNGHEDAUW B (1974) Cardiovasc Res 4, 464-469
BHAN AK, SCHEUER J (1972) Amer J Physiol 223, 1486-1490
BHAN AK, SCHEUER J (1975) Amer J Physiol 228, 1178-1182
BHAN AK, MALHOTRA A, SCHEUER J, CONTI MA, ADELSTEIN RS (1981) J Biol Chem 256, 7741-7743
BILEZIKJIAN LM, KRANIAS EG, POTTER JD, SCHWARTZ A (1981) Circ Res 49, 1356-1362
BLINKS JR, PRENDERGAST FG, ALLEN DG (1976) Pharmac Rev 28, 1-93
BLUMENTHAL DK, STULL JT (1980) Biochemistry 19, 5608-5614
BLUMENTHAL DK, STULL JT (1982) Biochemistry 21, 2386-2391
BOOTS J, UE K, HOZUMI T, SAMET J (1979) Biochemistry 18, 5157-5163
BRAHMS J, KAY CM (1963) J Biol Chem 238 ,198-206
BREMEL RD, MURRAY JM, WEBER A (1972) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 37, 267-275
BREMEL RD, SHAW ME (1978) FEBS Lett 88, 242-246
BROSTROM CO, HUANG YC, BRECKENBRIDGE BM, WOLFF DJ (1975) Proc Natl Acad Sci USA 72, 64-68
BRUTSAERT DL, CLAES VA, SONNENBLICK EH (1971a) Circ Res 29, 63-75
BRUTSAERT DL, CLAES VA, SONNENBLICK EH (1971b) J Physiol (London) 216, 319-330
BRUTSAERT DL, SONNENBLICK EH (1974) Acquisitions nouvelles en pathologie

cardiovasculaire 16, 401-429

BRUTSAERT DL, PAULUS WJ (1977) Cardiovascular Res 11, 1-16

BUCCINO RA, SPANN FJ, POOL PE, SONNENBLICK EH, BRAUNWALD E (1967) J Clin Invest 46, 1669-1682

BUCCINO RA, SPANN FJ, SONNENBLICK EH, BRAUNWALD E (1968) Endocrinology 82, 191-192

BURKE BE, DE LORENZO RJ (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78, 991-995

CARDINAUD R, DASSIN E, PELETIER F (1973) Biochem Biophys Res Commun 52, 1057-1063

CAREY RA, BOVE AA, SANTAMORE WP, SPANN JF (1981) Circulation 64, Suppl.IV, 276

CARONI P, CARAFOLI E (1981) J Biol Chem 256, 3263-3270

CARTAUD A, OZON R, WALSH MP, HAIECH J, DEMAILLE JG (1980) J Biol Chem 255, 9404-9408

CASSIDY PS, HOAR PE, KERRICK WGL (1979) J Biol Chem 254, 11148-11153

CASSIDY PS, KERRICK WGL (1982) Biochim Biophys Acta 705, 63-69

CAVADORE JC, MOLLA A, HARRICANE MC, GABRION J, BENYAMIN Y, DEMAILLE JG (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79, 3475-3479

CHACKO S, CONTI MA, ADELSTEIN RS (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74, 129-133

CHACKO S (1981) Biochemistry 20, 702-707

CHAFOULEAS JG, PARDUE RL, BRINKLEY BR, DEDMAN JR, MEANS AR (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78, 996-1000

CHALOVICH JM, EISENBERG E (1982)J Biol Chem 257, 2432-2437

CHEUNG WY (1970) Biochem Biophys Res Commun 38, 533-538

CHEUNG WY, BRADHAM LS, LYNCH TJ, LIN YM, TALLANT EA (1975) Biochem Biophys Res Commun 66, 1055-1062

CHEUNG WY (1980a) Science 207, 19-27

CHEUNG WY (1980b) Calcium and cell function, Vol. 1, Calmodulin. Academic Press, New York, NY

CHEUNG WY (1982) Federation Proc 41, 2253-2257

CHIZZONITE RA, EVERETT AN, CLARK WA, JACOVCIC S, RABINOWITZ M, ZAK R (1982) J Biol Chem 257, 2056-2065

CLARK AJ (1927) Comparative physiology of the heart. Mc Millan, New York, NY

CLARK WA Jr, CHIZZONITE RA, EVERETT AW, RABINOWITZ M, ZAK R (1982) J Biol

Chem 257, 5449-5454
COHEN P, BURCHELL A, FOULKES JG, COHEN PTW, VANAMAN TC, NAIRN AL (1978) FEBS Lett 92, 287-293
COHEN P (1982) Nature 296, 613-620
COLLINS JH (1976) Nature 259, 699-700
CONTI MA, ADELSTEIN RS (1981) J Biol Chem 256, 3178-3181
CONWAY G, HEAZLITT RA, FOWLER MO, GABEL M, GREEN S (1976) J Mol Cell Cardiol 8, 39-51
COOKE R (1972) Biochem Biophys Res Commun 49, 1021-1028
COOKE R, FRANKS K, STULL JT (1982) FEBS Lett 144, 33-37
COOPER G IV, SATAVA RM Jr, HARRISON CE, COLEMAN HN (1973) Circ Res 33, 213-223
COOPER G IV, TOMANEK RJ, EHRHARDT JC, MARCUS AL (1981) Circ Res 48, 488-497
CORABOEUF E, VASSORT G (1968) J Electrocardiology 1, 19-30
CORABOEUF E (1970) Physiologie, Vol. 3. KAYSER C Ed., Flammarion, 309-314
CORABOEUF E (1978) Amer J Physiol 234, H101-116
COULSON RL, YAZDANFAR S, RUBIO E, BOVE AA, LEMOLE GM, SPANN JF (1977) Circ Res 40, 41-49
CRAIG R, SMITH R, KENDRICK-JONES J (1983) Nature 302, 436-439
CROOKS R, COOKE R (1977) J Gen Physiol 69, 37-55
CROUGH TH, HOLROYDE MJ, COLLINS JH, SOLARO RJ, POTTER JD (1981) Biochemistry 20, 6318-6325
CROW MT, KUSHMERICK MJ (1982) Science 217, 835-837
CUTILLETTA AF, AUMONT MC, NAG AL, ZAK R (1977) J Mol Cell Cardiol 9, 399-407

DABROWSKA R, AROMATORIO D, SHERRY JMF, HARTSHORNE DJ (1977) Biochem Biophys Res Commun 78, 1263-1272
DABROWSKA R, HARTSHORNE DJ (1978) Biochem Biophys Res Commun 85, 1352-1359
DABROWSKA R, SHERRY JMF, AROMATORIO DK, HARTSHORNE DJ (1978) Biochemistry 17, 253-258
DABROWSKA R, HINKINS S, WALSH MP, HARTSHORNE DJ (1982) Biochem Biophys Res Commun 107, 1524-1531
DALLA-LIBERA L, SARTORE S (1981) Biochim Biophys Acta 669, 84-92
DANIEL JL, ADELSTEIN RS (1976) Biochemistry 15, 2370-2377

DE LANEROLLE P, ADELSTEIN RS, FERAMISCO JR, BURRIDGE K (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78, 4738-4742

DELCAYRE C, SWYNGHEDAUW B (1975) Pflugers Arch 355, 39-47

DELCAYRE C, SWYNGHEDAUW B (1979) Pathol Biol 27, 36-40

DELCAYRE C, MAROTTE F, BERCOVICI J, SWYNGHEDAUW B, RAPPAPORT L (1981) J Mol Cell Cardiol 13, Suppl. 1, 21

DELCAYRE C, MAROTTE F, RAPPAPORT L (1983) J Mol Cell Cardiol 15, 61-65

DELCAYRE C, SWYNGHEDAUW B, SAMUEL JL, BERTIER B, MAROTTE F, RAPPAPORT L (1983) soumis pour publication

DE LORENZO RJ, FREEDMAN SD, YOHE WB, MAURER SC (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76, 1838-1842

DEMAILLE JG, HAIECH J, GOODMAN M (1980) Protides of the biological fluids 28, 95-98

DE PAOLI-ROACH AA, GIBBS JB, ROACH PJ (1979) FEBS Lett 105, 321-324

DILLON PF, AKSOY MO, DRISKA SP, MURPHY RA (1981) Science 211, 495-497

DILLON PF, MURPHY RA (1982) Circ Res 50, 799-804

DI SALVO J, MILLER J, BLUMENTHAL D, STULL JT (1981) Biophys J 33, 276a

DREIZEN P, GERSHMAN LC (1970) Biochemistry 9, 1688-1693

DREIZEN P, RICHARDS DH (1972) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 27, 29-45

EATON BL, KOMINZ DR, EISENBERG E (1975) Biochemistry 14, 2718-2724

EBASHI S, ENDO M (1968) Progr Biophys Mol Biol 18, 123-183

EBASHI S, ENDO M, OHTSUKI I (1969) Quart Rev Biophys 2, 351-384

EBASHI S, NONOMURA Y (1973) The structure and function of muscle, Vol III. BOURNE GH Ed., Academic Press, New York, pp 286-356

EDELMAN AM, KREBS EG (1982) FEBS Lett 138, 293-298

EISENBERG E, MOOS C (1968) Biochemistry 7, 1486-1489

EISENBERG E, KIELLEY WW (1972) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 37, 145-152

ELLIOTT A, OFFER G (1978) J Mol Biol 123, 505-520

ENGELHARDT VA, LYUBIMOVA MN (1939) Nature 144, 668-669

ENGELHARDT VA, LYUBIMOVA MN, MEITINA RA (1941) C R Acad Sci URSS 30, 644

ENGLAND PJ (1975) FEBS Lett 50, 57-60

EVERETT AW, CLARK WA, CHIZZONITE RA, ZAK R (1983) J Biol Chem 258, 2421-2425

FABIATO A, FABIATO F (1977) Circ Res 40, 119-129
FABIATO A (1978) Annals N Y Acad Sci 307, 491-522
FABIATO A (1981) J Gen Physiol 78, 457-497
FLICKER PF, PHILLIPS Jr GN, COHEN G (1982) J Mol Biol 162, 495-501
FLINK IL, RADER JH, BANERJEE SK, MORKIN E (1978) FEBS Lett 94, 125-131
FOX JEB, PHILLIPS DR (1982) J Biol Chem 257, 4120-4126
FOYT AJ, GUERRIERO Jr V, MEANS AR (1982) J Cell Biol 95, 364a
FRANK G, WEEDS AG (1974) Eur J Biochem 44, 317-344
FRANKS K, COOKE R, STULL JT (1983) Biophys J 41, 258a
FREARSON N, PERRY SV (1975) Biochem J 151, 99-107
FREARSON N, FOCANT BWW, PERRY SV (1976a) FEBS Lett 63, 27-32
FREARSON N, SOLARO RJ, PERRY SV (1976b) Nature 264, 801-802
FREEDBERG AS, HAMOLSKY MW (1974) Handbook of Physiology, Section 7, Vol 1, The thyroid. GREER MA, SOLOMON DH Eds. American Physiological Society, Washington DC, pp 435-468

GILLIS JM (1977) J Physiol (Paris) 73, 863-876
GOLDSPINK G (1975) Comparative physiology : fuctional aspects of structural materials. BOLIS L, MADDRELL HP, SCHMIDT-NIELSEN K Eds. North Holland, Amsterdam, pp 173-185
GOODKIND MJ, DAMBACH GE, THYRUM PT, LUCHI RJ (1974) Amer J Physiol 226, 66-72
GOODMAN M, PECHERE JF, HAIECH J, DEMAILLE JG (1979) J Mol Evol 13, 331-352
GOPINATH RM, VINCENZI FF (1977) Biochem Biophys Res Commun 77, 1203-1209
GRAND RJA, PERRY SV (1979) Biochem J 183, 285-295
GRANDE F, TAYLOR HL (1965) Handbook of Physiology, Section 2, Vol 3. HAMILTON WF Ed., American Physiological Society, Washington DC , p 2615
GUERRIERO V, ROWLEY DR, MEANS AR (1981) cell 27, 449-458
GUNNING JF, HARRISON Jr CE , COLEMAN HM (1974) Amer J Physiol 226, 1166-1171

HAIECH J, KLEE CB, DEMAILLE JG (1981) Biochemistry 20, 3890-3897
HAMRELL BB, ALPERT NR (1977) Circ Res 40, 20-25
HAMRELL BB, LOW RB (1978) Pflugers Arch 377, 119-124
HARPER JF, CHEUNG WY, WALLACE RW, HUANG HL, LEVINE SN, STEINER AL (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77, 366-370

HARTSHORNE DJ, MRWA U (1980) Calcium-binding proteins : structure and function. SIEGEL FL, CARAFOLI E, KRETSINGER RH, Mc LENNAN DH, WASSERMAN RH Eds., Elsevier-North Holland, pp 255-262

HASELGROVE JC (1972) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 37, 341-352

HATHAWAY DR, ADELSTEIN RS (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76, 1653-1657

HATHAWAY DR, ADELSTEIN RS, KLEE CB (1981) J Biol Chem 256, 8183-8189

HATT PY, BERJAL G, MORAVEC J, SWYNGHEDAUW B (1970) J Mol Cell Cardiol 1, 235-247HATT PY, GROSGOGEAT Y (1970) La Presse Médicale 15, 687-692

HELLAM DC, PODOLSKY RJ (1969) J Physiol (London) 200, 807-819

HENDERSON AH, CRAIG RJ, SONNENBLICK EH, URSCHEL CW (1970) Proc Soc Exp Biol Med 134, 930-932

HIDAKA H, NAKA M, YAMAKI T (1979) Biochem Biophys Res Commun 90, 694-699

HIGH CW, STULL JT (1980) Amer J Physiol 239, H756-764

HIGUCHI M, STEWART D, MASON DT, IKEDA R, WIKMAN-COFFELT J (1978) Comp Biochem Physiol 60, 495-499

HILL AV (1938) Proc R Soc Lond (Biol) 126, 136-195

HINDS TR, LARSEN FL, VINCENZI FF (1978) Biochem Biophys Res Commun 81, 455-461

HJALMARSON AC, WHITFIELD GF, MORGAN HE (1970) Biochem Biophys Res Commun 41, 1584-1589

HOAR PE, KERRICK WGL, CASSIDY PS (1979) Science 204, 503-506

HOH JFY, Mc GRATH PA, HALE PT (1978) J Mol Cell Cardiol 10, 1053-1076

HOLROYDE MJ, HOWE E, SOLARO RJ (1979) Biochim Biophys Acta 586, 63-69

HOLROYDE MJ, POTTER JD, SOLARO RJ (1979a) J Biol Chem 254, 6478-6482

HOLROYDE MJ, SMALL DAP, HOWE E, SOLARO J (1979b) Biochim Biophys Acta 587, 628-637

HOLROYDE MJ, ROBERTSON SP, JOHNSON JD, SOLARO RJ, POTTER JD (1980) J Biol Chem 254, 11688-11693

HORACKOVA M, VASSORT G (1976) J Physiol (London) 259, 597-616

HOZUMI T, MUHLRAD A (1981) Biochemistry 20, 2945-2950

HUANG CY, CHAU V, CHOCK PB, WANG JH, SHARMA RK (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78, 871-874

HUSZAR G, ELZINGA M (1972) J Biol Chem 247, 745-753

HUSZAR G (1975) J Mol Biol 94, 311-326

HUXLEY AF (1957) Prog Biophys Biophys Chem 7, 255-318

HUXLEY HE, BROWN W (1967) J Mol Biol 30, 385-434

HUXLEY HE (1969) Science 164, 1356-1366
HUXLEY HE (1972) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 37, 361-376

ITAYA K, UI M (1966) Clin Chim Acta 14, 361-366

JARRETT HW, PENNINSTON JT (1977) Biochem Biophys Res Commun 77, 1210-1216
JEACOCKE S.A., ENGLAND P.J. (1980) Biochem J 188, 763-768
JOHNSON DJ, HOLROYDE MJ, CROUCH TH, SOLARO RJ, POTTER JD (1981) J Biol Chem 256, 12194-12198
JOHNSON P, PERRY SV (1970) Biochem J 119, 293-301
JOUANNOT P, GOURDIER B, HATT PY (1973) Arch Mal Coeur Vx 66, 1067-1076

KAKIUCHI S, YAMAZAKI R (1970) Biochem Biophys Res Commun 41, 1104-1110
KAKIUCHI S, SOBUE K (1981) FEBS Lett 132, 141-143
KAKIUCHI S, SOBUE K, FUJITA M (1981) FEBS Lett 132, 144-148
KAKIUCHI S, SOBUE K, KANDA K, MORIMOTO K (1982) FEBS Lett 138, 173-177
KAKOL I, KASMAN K, MICHNICKA M (1982) Biochim Biophys Acta 704, 437-443
KARDAMI E, GRATZER WB (1982) J Mol Cell Cardiol 14, 73-80
KATAGIRI T, MORKIN E (1974) Biochim Biophys Acta 342, 262-274
KATOH N, WRENN RW, WISE BC, SHOJI M, KUO JF (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78, 4813-4817
KATZ AM, REPKE DI (1966) Science 152, 1242-1243
KATZ S, REMTULLA MA (1978) Biochem Biophys Res Commun 83, 1373-1379
KENNEDY MB, GREENGARD P (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78, 1293-1297
KERRICK WGL, MALENCIK DA, HOAR PE, POTTER JD, COBY RL, POCINWONG S, FISCHER EH (1980) Pflugers Arch 386, 207-213
KINOSHITA N, KUBO S, ONISHI H, TONOMURA Y (1969) J Biochem (Tokyo) 65, 285-301
KLEE CB (1977) Biochemistry 16, 1017-1024
KLEE CB, CROUCH TH, KRINKS MH (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76, 6270-6273
KLEE CB, CROUCH TH, RICHMAN PG (1980) Ann Rev Biochem 49, 489-515
KLEID JJ, TADA M, REPKE DI, KATZ AM (1972) J Mol Cell Cardiol 4, 625-632
KLOTZ C, AUMONT MC, LEGER JJ, SWYNGHEDAUW B (1975) Biochim Biophys Acta 386, 461-469
KLOTZ C, LEGER JJ, ELZINGA M (1982) Circ Res 50, 201-209
KLUG GA, BOTTERMAN BR, STULL JT (1982) J Biol Chem 257, 4688-4690

KOPP SJ, BARANY M (1979) J Biol Chem 254, 12007-12012
KORETZ JF, FREDERIKSEN DW (1981) Biophys J 33, 235a
KORNER M, VAN THIEM N, LACOMBE G, SWYNGHEDAUW B (1982) Biochem Biophys Res Commun 105, 1198-1207
KREBS EG, BEAVO JA (1979) Ann Rev Biochem 48, 923-959
KRETSINGER RH, BARRY CD (1975) Biochem Biophys Res Commun 405, 40-52
KRITCHER EM, THYRUM PT, LUCHI RJ (1970) Biochim Biophys Acta 221, 264-271
KUEHL WM, ADELSTEIN RS (1970) Biochem Biophys Res Commun 39, 956-963

LACOMBE G, VAN THIEM N, SWYNGHEDAUW B (1981) Biochemistry 20, 3648-3653
LEBOWITZ EA, COOKE R (1979) J Biochem 85, 1489-1494
LECARPENTIER Y, MARTIN JL, GASTINEAU P, HATT PY (1982) Amer J Physiol 242, H855-861
LECLERCQ JF, SWYNGHEDAUW B (1976) Europ J Clin Invest 6, 27-33
LEGER JJ, BERSON B, DELCAYRE C, KLOTZ C, SCHWARTZ K, LEGER J, STEPHENS M, SWYNGHEDAUW B (1975) Biochimie 57, 1249-1273
LEGER JJ, MAROTTE F (1975) FEBS Lett 52, 17-21
LEGER JJ, ELZINGA M (1977) Biochem Biophys Res Commun 74, 1390-1395
LEGER JJ, KLOTZ C, PRETESEILLE M (1980) Biochimie 62, 803-809
LEGER J (1980) La tropomyosine cardiaque.Thèse de doctorat ès-sciences, Paris XI-Orsay
LE PEUCH CJ, HAIECH J, DEMAILLE JG (1979) Biochemistry 18, 5150-5157
LITTEN RZ III, MARTIN BJ, HOWE ER, ALPERT NR, SOLARO RJ (1981) Circ Res 48, 498-501
LOMPRE AM, SCHWARTZ K, d'ALBIS A, LACOMBE G, VAN THIEM N, SWYNGHEDAUW B (1979) Nature 282,105-107
LOMPRE AM, MERCADIER JJ, WISNEWSKY C, BOUVERERT P, PANTALONI C, d'ALBIS A, SCHWARTZ K (1981) Develop Biol 84, 286-290
LOMPRE AM (1982) Les isoenzymes de la myosine cardiaque.Thèse de doctorat ès-sciences, Paris XI-Orsay
LONG L, FABIAN F, MASON DT, WIKMAN-COFFELT J (1977) Biochem Biophys Res Commun 76, 626-635
LOWEY S, SLAYTER HS, WEEDS AG, BAKER H (1969) J Mol Biol 42, 1-29
LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) J Biol Chem 193, 265-275
LUCHI RJ, KRITCHER EM, CONN HL (1965) Circ Res 16, 74-82

LUCHI RJ, KRITCHER EM, THYRUM PT (1969) Circ Res 24, 513-519
LYMN RW, TAYLOR EW (1971) Biochemistry 10, 4617-4624

MAHDAVI V, PERIASAMY M, NADAL-GINARD B (1982) Nature 297, 659-664
MALHOTRA A, PENPARGKUL S, FEIN FS, SONNENBLICK EH, SCHEUER J (1981) Circ Res 49, 1243-1250
MALHOTRA A, PENPARGKUL S, SCHAIBLE T, SCHEUER J (1981) Amer J Physiol 241, H263-267
MANNING DR, STULL JT (1979) Biochem Biophys Res Commun 90, 164-170
MANNING DR, STULL JT (1982) Amer J Physiol 242, C234-C241
MARCUM JM, DEDMAN JR, BRINKLEY BR, MEANS AR (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75, 3771-3775
MARTIN F, GABRION J, CAVADORE JC (1981) FEBS Lett131, 235-238
MARTIN AF, PAGANI ED, SOLARO RJ (1982) Circ Res 50, 117-124
MATSUDA G, MAITA T, KATO Y, CHEN JI, UMEGANE T (1981) FEBS Lett 135, 232-236
MAUGHAM D, LOW E, LITTEN R, BRAYDEN J, ALPERT NR (1979) Circ Res 44, 279-287
MAYR GW, BURGER S, SCHNEIDER A, STRAUER BE (1980) Eur J Clin Invest 10, 25 (Abstract)
McCARL RL, MARGOSSIAN SS, JACKMAN LM, WEBB RL (1969) Biochemistry 8, 3659-3665
McMANUS JP, BRACELAND BM, RIXON RH, WHITFIELD JF, MORRIS HP (1981) FEBS Lett 133, 99-102
MEANS AR, DEDMAN JR (1980) Nature 285, 73-77
MEDUGORAC I (1975) Experientia 31, 941-942
MENDELSON RA,MORALES FM, BOTTS J (1973) Biochemistry 12, 2250-2255
MESHKOV AB, CAREY RA, BOVE AA, SANTAMORE WP, SPANN JF (1981) Biochem Med 25, 298-308
MICHNICKA M, KASMAN K, KAKOL I (1982) Biochim Biophys Acta 704, 470-475
MIKAWA T, NONOMURA Y, EBASHI S (1977) J Biochem (Tokyo) 82, 1789-1791
MIKAWA T, NONOMURA Y, HIRATA M, EBASHI S, KAKIUCHI S (1978) J Biochem 84, 1633-1636
MOLLA A, KILHOFFER MC, FERRAZ C, AUDEMARD E, WALSH MP, DEMAILLE JG (1981) J Biol Chem 256, 15-18
MOORE PB, HUXLEY HE, DE ROSIER DJ (1970) J Mol Biol 50, 279-295

MOORE PB, DEDMAN JR (1982) Life Sci 31, 2937-2946
MORGAN JL, HOLLADAY CR, SPOONER BS (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77, 2069-2073
MORIMOTO K, HARRINGTON WF (1974) J Mol Biol 83, 83-97
MORKIN E (1979) Circ Res 44, 1-7
MORKIN E, FLINK IL, BANERJEE SK (1979) J Biol Chem 254, 12647-12652
MORNET D, PANTEL P, AUDEMARD E, KASSAB R (1979) Biochem Biophys Res Commun 89, 925-932
MORNET D, PANTEL P, BERTRAND R, AUDEMARD E, KASSAB R (1980) FEBS Lett 117, 183-188
MORNET D, BERTRAND R, PANTEL P, AUDEMARD E, KASSAB R (1981,a) Nature 292, 301-306
MORNET D, BERTRAND R, PANTEL P, AUDEMARD E, KASSAB R (1981,b) Biochemistry 20, 2110-2126
MRWA U, HARTSHORNE DJ (1980) Federation Proc 39, 1564-1568
MUIR JR, WEBER A, OLSON RE (1971) Biochim Biophys Acta 234, 195-209
MURPHY AJ, MORALES MF (1970) Biochemistry 9, 1528-1532
MURRAY KJ, ENGLAND PJ (1980) Biochem J 192, 967-970

NAGO S, SUZUKI Y, WATANABE Y, NOZAWA Y (1979) Biochem Biophys Res Commun 90, 261-268
NAIRN AC, PERRY SV (1979) Biochem J 179, 89-97
NAKASHIMA K, FUJII S, KAKU K, KANEKO T (1982) FEBS Lett 104, 285-289
NGUYEN HT, GUBITS RM, WYDRO RM, NADAL-GINARD B (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79, 5230-5234
NISHIDA E, KUMAGAI H, OHTSUKI I, SAKAI H (1979) J Biochem (Tokyo) 85, 1257-1266
NOIMAN ES (1980) J Biol Chem 255, 11067-11070
NUNNALY MH, STULL JT (1983) Biophys J 41, 246a
NWOYE LO, GOLDSPINK G (1981) Experientia 37, 856-857

O'FARRELL PZ, GOODMAN HM, O'FARRELL PH (1977) Cell 12, 1133-1142
PALFREY HC, SCHIEBLER W, GREEGARD P (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79, 3780-3784
PANNIER JL (1968) Arch Int Physiol 76, 477-490
PATO MA, ADELSTEIN RS (1982) Methods in enzymology, Vol. 85, Part B.

FREDERIKSEN DW, CUNNINGHAM LW Eds., Academic Press, pp 308-305
PEMRICK SM (1980) J Biol Chem 255, 8836-8841
PENPARGKUL S, MALHOTRA A, SCHAIBLE T, SCHEUER J (1980) J Appl Physiol 48, 409-413
PERRIE WT, PERRY SV (1970) Biochem J 119, 31-38
PERRIE WT, SMILLIE LB, PERRY SV (1973) Biochem J 135, 151-164
PERRY SV, COLE HA, FREARSON N, MOIR AJG, NAIRN AC, SOLARO JR (1978) Proceedings of the 12th FEBS meeting, Dresden, 54, 147-159
PERRY SV (1980) Muscle contraction : its regulatory mechanisms. EBASHI S, MARUYAMA K, ENDO M Eds., Springer Verlag, Berlin, pp 207-220
PERSECHINI A, HARTSHORNE DJ (1981) Science 213, 1383-1385
PERSECHINI A, MRWA U, HARTSHORNE DJ (1981) Biochem Biophys Res Commun 98, 800-805
PERSECHINI A, HARTSHORNE DJ (1983) Biochemistry 22, 470-476
PINTER K, MABUCHI K, SRETER FA (1981) FEBS Lett 128, 336-338
PIRES EM, PERRY SV, THOMAS MAW (1974) FEBS Lett 41, 292-296
PIRES EM, PERRY SV (1977) Biochem J 167, 137-146
POPE B, WAGNER PD, WEEDS AG (1981) Eur J Biochem 117, 201-206
POTTER JD, GERGELY J (1974) Biochemistry 13, 2697-2703
POTTER JD, HOLROYDE MJ, ROBERTSON, SOLARO RJ, KRANIAS EG, JOHNSON JD (1982) Cell and muscle motility, Vol. 2. DOWBEN RM, SHAY JW Eds., Plenum Press, New York, pp 245-255

RAMIREZ F, SHUKLA KK, LEVY HM (1979) J Theor Biol 76, 351-357
RAPPAPORT L, ADELSTEIN RS (1980) Federation Proc 39, 2041
RESINK TJ, GEVERS W (1981) Cell Calcium 2, 105-123
RESINK TJ, GEWERS W, NOAKES TD, OPIE LH (1981a) J Mol Cell Cardiol 13, 679-684
RESINK TJ, GEVERS W, NOAKES TD (1981b) J Mol Cell Cardiol 13, 753-765
REUTER H (1974) Circ Res 34, 599-605
RINALDI ML, LE PEUCH CJ, DEMAILLE JG (1981) FEBS Lett 129, 277-281
RINGER S (1883) J Physiol (London) 4, 29-42
ROBERTSON SP, JOHNSON JD, HOLROYDE MJ, KRANIAS EG, POTTER JD, SOLARO RJ (1982) J Biol Chem 257, 260-263
ROUGIER O, VASSORT G, GARNIER D, GARGOUIL YM, CORABOEUF E (1969) Pflugers Arch 308, 91-110

ROVETTO MJ, HJALMARSON AC, MORGAN HE, BARRETT MJ, GOLDSTEIN RA (1972) Circ Res 31, 397-409

RUEGG JC, PFITZER G, HOFMANN F (1982) Erwin Riesch Symposium on Cardiac Overload, Tubingen, RFA, p 27

RUPP H (1981) Basic Res Cardiol 76, 79-88

SAIDAPET CR, MUNRO HN, VALGEIRSDOTTIR K, SARKAR S (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79, 3087-3091

SALISBURY JL, CONDEELIS JS, MAIHLE NJ, SATIR P (1981) Nature 294, 163-166

SAMUEL JL, RAPPAPORT L, MERCADIER JJ, LOMPRE AM, SARTORE S, TRIBAN C, SCHIAFFINO S, SCHWARTZ K (1983) Circ Res 52, 200-209

SARKAR S, SRETER FA, GERGELY J (1971) Proc Natl Acad Sci USA 68, 946-950

SARTORE S, PIEBORON-BORMIOLI S, SCHIAFFINO S (1979) Nature 274, 82-83

SARTORE S, GORZA L, PIEBORON-BORMIOLI S, DALLA-LIBERA L, SCHIAFFINO S (1981) J Cell Biol 88, 226-233

SASAKI Y, HIDAKA H (1982) Biochem Biophys Res Commun 104, 451-456

SCHAIBLE TF, SCHEUER J (1979) J Appl Physiol 46, 854-860

SCHEUER J, BHAN AK (1979) Circ Res 45, 1-12

SCHOLEY JM, TAYLOR KA, KENDRICK-JONES J Nature 287, 233-235

SCHULMAN H, GREENGARD P (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75, 5432-5436

SCHWARTZ K, BOUVERET P, SEBAG C, SWYNGHEDAUW B (1977) Biochim Biophys Acta 495,24-36

SCHWARTZ K, BOUVERET P, BERCOVICI J, SWYNGHEDAUW B (1978) FEBS Lett 93, 137-140

SCHWARTZ K, LOMPRE AM, BOUVERET P, WISNEWSKY C, SWYNGHEDAUW B (1980) Eur J Biochem 104, 341-346

SCHWARTZ K, LOMPRE AM, BOUVERET P, WYSNEWSKY C, WHALEN RG (1982) J Biol Chem 257, 14412-14418

SCORDILIS SP, UHLENDORF BW, SCARPA S, CANTONI GL, MILES JM, ADELSTEIN RS (1981) Biochemistry 20, 3511-3516

SEKINE T, YAMAGUCHI M (1963) J Biochem 54, 196-198

SELLERS JR, PATO MD, ADELSTEIN RS (1981) J Biol Chem 256, 13137-13142

SEYMOUR J, O'BRIEN EJ (1980) Nature 283, 680-682

SHERRY JMF, GORECKA A, AKSOY MO, DABROWSKA R, HARTSHORNE DJ (1978) Biochemistry 17, 4411-4418

SHETERLINE P (1980) Biochem Biophys Res Commun 93, 194-200

SHIVERICK KT, HAMRELL BB, ALPERT NR (1976) J Mol Cell Cardiol 8, 837-851

SILBERSTEIN L, LOWEY S (1977) Biochemistry 16, 4403-4408

SILVER PJ, STULL JT (1982) J Biol Chem 257, 6145-6150

SINGH TJ, AKATSUKA A, HUANG KP, SHARMA RK, TAM SW, WANG JH (1982) Biochem Biophys Res Commun 107, 676-683

SINHA AM, UMEDA PK, KAVINSKY CJ, RAJAMANICKAM C, HSU HJ, JAKOVCIC S, RABINOWITZ M (1982) Proc Natl Acad Sci USA 79, 5847-5851

SIRAVAMAKRISHNAN M, BURKE M (1982) J Biol Chem 257, 1102-1105

SISTARE FD, LICHTENBERG L, SUGG RG, McFARLAND SA, VILLAR-PALASI C (1981) J Cyclic Nucl Res 7, 85-93

SKELTON CL, KARCH FE, WILDENTHAL K (1973) Amer J Physiol 224, 957-962

SKELTON CL, SONNENBLICK EH (1974) Circ Res 34-35, 1183-1196

SOBIESZEK A, SMALL JV (1977) J Mol Biol 112, 559-576

SOBUE K, ICHIDA S, YOSHIDA H, YAMAZAKI R, KAKIUCHI S (1979) FEBS Lett 99, 199-202

SOLARO JR, WISE RM, SHINER JS, BRIGGS FN (1974) Circ Res 34, 525-530

SOMMER JR, JOHNSON EA (1979) Handbook of Physiology, Section 2, Vol 1. BERNE RM Ed., American Physiological Society, Bethesda, MD, pp 113-186

SONNENBLICK EH (1962) Amer J Physiol 202, 931-939

SPANN JF Jr, BUCCINO RA, SONNENBLICK EH, BRAUNWALD E (1967) Circ Res 21, 341-354

SQUIRE JM (1972) J Mol Biol 72, 125-138

SQUIRE JM (1981) The structural basis of muscular contraction, Plenum Press, New York

SRIVASTAVA S, HARTSHORNE DJ (1983) Biochem Biophys Res Commun 110, 701-708

STEIN LA, SCHWARTZ R, CHUCK PB, EISENBERG E (1979) Biochemistry 18, 3895-3909

STRACHER A (1969) Biochem Biophys Res Commun 35, 519-523

STRAUER BE, SCHERPE E (1975) Basic Res Cardiol 70, 130-141

STULL JT, BUSS JE (1977) J Biol Chem 252, 851-857

STULL JT, HIGH CW (1977) Biochem Biophys Res Commun 77, 1078-1083

STULL JT, MAYER SE (1979) Handbook of Physiology, Section 2, Vol 1. BERNE RM Ed., American Physiological Society, Bethesda, pp 741-774

STULL JT, MANNING DR, HIGH CS, BLUMENTHAL DK (1980) Federation Proc 39, 1552-1557

SWEENEY HL, POTTER JD, KUSHMERICK MJ (1983) Biophys J 41, 148a

SWYNGHEDAUW B, KLOTZ C, LEGER JJ, PRETESEILLE M (1973) J Mol Cell Cardiol 5, 501-514
SWYNGHEDAUW B, LEGER JJ, SCHWARTZ K (1976) J Mol Cell Cardiol 8, 915-924
SWYNGHEDAUW B, DELCAYRE C (1982) Pathobiology Annual 12, 137-183
SYROVY Y (1975) Pflugers Arch 356, 87-92
SYROVY Y, GUTMANN E (1975) Physiol Bohemoslovaca 24, 325-334
SYROVY Y, DELCAYRE C, SWYNGHEDAUW B (1979) J Mol Cell Cardiol 11, 1129-1135
SYROVY Y (1982) Comp Biochem Physiol 72 B, 289-293
SZILAGYI L, BALINT M, SRETER FA, GERGELY J (1979) Biochem Biophys Res Commun 87, 936-945

TADA M, KIRCHBERGER M, REPKE D, KATZ AM (1974) J Biol Chem 249, 6174-6180
TAICHMAN G, KORECKY B (1970) Fed Proc 29, 321
TANAKA T, NAKA M, HIDAKA H (1980) Biochem Biophys Res Commun 92, 313-318
TAYLOR EW (1979) CRC Crit Rev Biochem 6, 103-164
TAYLOR KA, AMOS LA (1981) J Mol Biol 147, 297-324
THYRUM PT, KRITCHER EM, LUCHI RJ (1970) Biochim Biophys Acta 197, 335-336
TRAYER IP, PERRY SV (1966) Biochemical Zeitschrift 345, 87-100
TROTTER JA, ADELSTEIN RS (1979) J Biol Chem 8781-8785
TUAZON PT, STULL JT, TRAUGH JA (1982) Biochem Biophys Res Commun 108, 910-917

UCHIWA H, KATO T, ONISHI H, ISOBE T, OKUYAMA T, WATANABE S (1982) J Biochem (Tokyo) 91, 273-282
UEDA S, YAZAKI Y (1981) J Biochem (Tokyo) 90, 555-558
URTHALER F, WALKER AA, HEFNER LL, JAMES STN (1975) Circ Res 37, 762-771

VALLET B, MOLLA A, DEMAILLE JG (1981) Biochim Biophys Acta 674, 256-264
VANDEKERCHKOVE J, WEBER K (1979) Differentiation 14, 124-133
VAN THIEM N, LACOMBE G, SWYNGHEDAUW B (1978) Eur J Biochem 91, 243-248

WAGNER PD (1977) FEBS Lett 81, 81-85
WAGNER PD, WEEDS AG (1977) J Mol Biol 109, 455-470
WAGNER PD, GINIGER E (1981) Nature 292, 560-562
WAISMAN DM, SINGH TJ, WANG JH (1978) J Biol Chem 253, 3387-3390

WALSH MP, VALLET B, AUTRIC F, DEMAILLE JG (1979) J Biol Chem 254, 12136-12144

WALSH MP, CAVADORE JC, VALLET B, DEMAILLE JG (1980a) Can J Biochem 58, 299-308

WALSH MP, VALLET B, CAVADORE JC, DEMAILLE JG (1980b) J Biol Chem 255, 335-337

WALSH MP (1981) Cell Calcium 2 333-352

WALSH MP, GUILLEUX JC (1981) Adv Cyclic Nucl Res 14, 375-390

WALSH MP, PERSECHINI A, HINKINS S, HARTSHORNE DJ (1981) FEBS Lett 126, 107-110

WALSH MP, DABROWSKA R, HINKINS S, HARTSHORNE DJ (1982 a) Biochemistry 21, 1919-925

WALSH MP, HINKINS S, FLINK IL, HARTSHORNE DJ (1982 b) Biochemistry 21, 6890-6896

WALSH MP, BRIDENBAUGH R, HARTSHORNE DJ, KERRICK WGL (1982 c) J Biol Chem 257, 5987-5990

WANG JH, WAISMAN DM (1979) Current Topics in Cellular Regulation 15, 47-107

WATTERSON DM, VINCENZI FF Eds (1980) Calmodulin and cell functions. Annals NY Acad Sci 356

WEBER A, HERZ R, REISS I (1963) J Gen Physiol 46, 679-702

WEBER A, HERZ R, REISS I (1964) Federation Proc 23, 896-900

WEEDS AG, LOWEY S (1971) J Mol Biol 61, 701-725

WEEDS AG, FRANK G (1972) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 37, 9-14

WEEDS AG, TAYLOR RS (1975) Nature 257, 54-56

WEEDS AG (1976) Eur J Biochem 66, 157-173

WEEDS AG, POPE B (1977) J Mol Biol 111, 129-152

WEEDS AG (1978) Nature 274, 417-422

WEI JW, HICKIE RA (1981) Biochem Biophys Res Commun 100, 1562-1568

WEISS B, PROZIALECK W, CIMINO M, BARNETTE MS, WALLACE TL (1980) Calmodulin and Cell Functions. WATTERSON DM, VINCENZI FF Eds. NY Acad Sci Press, New York, pp 319-345

WELSH MJ, DEDMAN JR, BRINKLEY BR, MEANS AR (1979) J Cell Biol 81, 624-634

WERTH DK, HAEBERLE JR, HATHAWAY DR (1982) J Biol Chem 257, 7306-7309

WESTWOOD SA, PERRY SV (1981) Biochem J 197, 185-193

WESTWOOD SA, PERRY SV (1982) FEBS Lett 142, 31-34

WHALEN RG, BUTLER-BROWNE GS, GROS F (1976) Proc Natl Acad Sci USA 73, 2018-2022

WHALEN RG, SELL SM, BUTLER-BROWNE GS, SCHWARTZ K, BOUVERET P, PINSET-HARSTROM I (1981) Nature 292, 805-809

WIEDNER H, WETZEL R, ECKSTEIN F (1978) J Biol Chem 253, 2763-2768

WIKMAN-COFFELT J, FENNER C, SMITH A, MASON DT (1975) J Biol Chem 250, 1257-1262

WILKERSON JE, EWONUK E (1971) J Appl Physiol 30, 328-330

WINEGRAD S (1979) Handbook of Physiology, Section 2, Vol 1. BERNE RM Ed., American Physiological Society, Bethesda, MD, pp 393-428

WINKELMANN DA, LOWEY S (1983) Biophys J 41, 228a

WOLF H, HOFMANN F (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77, 5852-5855

WYDRO RM, NGUYEN HT, GUBITS RM, NADAL-GINARD B (1983) J Biol Chem 258, 670-678

YAGI K, OTANI F (1974) J Biochem 76, 365-373

YAGI K, YAZAWA M, KAKIUCHI S, OHSHIMA M (1978) J Biol Chem 253, 1338-1340

YAMAMOTO K, SEKINE T (1979a) J Biochem (Tokyo) 86, 1855-1862
(1979b) J Biochem (Tokyo) 86, 1863-1868
(1979c) J Biochem (Tokyo) 86, 1869-1881

YAMAUCHI T, FUJIZAWA H (1981) FEBS Lett 129, 117-120

YANG Y, GORDON DJ, KORN ED, EISENBERG E (1977) J Biol Chem 252, 3374-3378

YANG SD, TALLANT EA, CHEUNG WY (1982) Biochem Biophys Res Commun 106, 1419-1425

YAZAKI Y, RABEN MS (1974) Circ Res 35, 15-21

YAZAKI Y, RABEN MS (1975) Circ Res 36, 208-215

YAZAKI Y, UEDA S, MAGAI R, SHIMADA K (1979) Circ Res 45, 522-527

YAZAWA M, YAGI K (1977) J Biochem (Tokyo) 82, 287-289

YAZAWA M, KUWAYAMA H, YAGI K (1978) J Biochem (Tokyo) 84, 1253-1258

YAZAWA M, YAGI K (1978) J Biochem (Tokyo) 84, 1259-1265

ZAKUT R, SHANI M, GIVOL D, NEUMAN S, YAFFE D, NUDEL U (1982) Nature 298, 857-859

ZOT HG, POTTER JD (1982) J Biol Chem 257, 7678-7683

RESUME

Ce travail concerne les modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles de la myosine cardiaque.

Les modifications physiologiques d'activité ATPase de la myosine du coeur de différentes espèces animales sont reliées aux variations de la contractilité cardiaque. Cette relation est conservée dans les situations pathologiques comme la thyrotoxicose et la surcharge mécanique cardiaque. Les variations d'activité enzymatique de la myosine représentent un des mécanismes d'adaptation utilisés par le myocarde pour conserver un rendement énergétique de la fibre optimal.

La phosphorylation de la myosine ne semble pas intervenir dans le contrôle de l'activité ATPase au cours de la phase chronique de l'hypertrophie cardiaque.

MOTS CLES

Myosine cardiaque. Myosine ATPase. Hypertrophie cardiaque. Thyrotoxicose. Phosphorylation de la myosine. Myosine kinase cardiaque. Kinases calmoduline-dépendantes.